



ANA PAULA CASTRO SANTOS

**EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA PRÉVIA À IATF NÃO
INTERFERE NA QUALIDADE OOCITÁRIA E EXPRESÃO
GÊNICA DE CÉLULAS DO CUMULUS DE VACAS *Bos indicus*
EM ANESTRO**

LAVRAS – MG

2021

ANA PAULA CASTRO SANTOS

**EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA PRÉVIA À IATF NÃO INTERFERE NA
QUALIDADE OOCITÁRIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS DO CUMULUS
DE VACAS *Bos indicus* EM ANESTRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

LAVRAS – MG

2021

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Santos, Ana Paula Castro.

Exposição à progesterona prévia à IATF não interfere na
qualidade oocitária e expressão gênica de células do cumulus de
vacas *Bos indicus* em anestro / Ana Paula Castro Santos. - 2021.
63 p.

Orientador(a): José Nélio de Sousa Sales.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.
Bibliografia.

1. IATF. 2. Progesterona. 3. Qualidade oocitária. I. Sales, José
Nélio de Sousa. II. Título.

ANA PAULA CASTRO SANTOS

**EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA PRÉVIA À IATF NÃO INTERFERE NA
QUALIDADE OOCITÁRIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS DO CUMULUS
DE VACAS *Bos indicus* EM ANESTRO**

**EXPOSURE TO PROGESTERONE PRIOR TO TAI DOES NOT INTERFERE WITH
OOCYTE QUALITY AND GENE EXPRESSION OF CUMULUS CELLS OF *Bos*
indicus IN ANESTRUS COWS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de setembro de 2021.

Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Dr. Miller Pereira Palhão	UFLA
Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira	EPAMIG

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

LAVRAS MG

2021

Ao Antônio, por me mostrar minha verdadeira missão nessa vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A conclusão de um doutorado, por si só, é laboriosa e cheia de percalços. De maneira especial, finalizá-lo em meio à chegada de um filho e que foi coincidente à pandemia que modificou tantas outras coisas, foi um grande e grato desafio. Mas isso não seria possível sem a maravilhosa rede de apoio que possuo.

Em primeiro lugar agradeço a Deus! Ele, que na sua infinita bondade e sabedoria, sempre me deu muito mais do que mereço, e também à Nossa Senhora Aparecida, que por tantas vezes foi a minha mais fiel intercessora.

Ao meu marido, Marcelo, a pessoa mais generosa que conheço, agradeço por caminhar ao meu lado e ser meu ponto de equilíbrio. Por sonhar comigo, compreender minha ausência em tantos momentos e me ajudar na realização de tantos sonhos, inclusive na execução desse projeto. Juntos formamos o que tenho de mais valioso hoje: a nossa família! Ao Antônio, nosso filho, agradeço por me apresentar o amor incondicional e por me amar da maneira mais pura e intensa que já senti. Mas além disso, por me mostrar diariamente que sou muito mais forte do que sempre imaginei ser. Você me transformou!

Aos meus amados pais, Marquinho e Luci, fonte inesgotável de doação e oração, que sempre fizeram absolutamente tudo por mim, muito obrigada. Obrigada, papai, por ser meu exemplo de trabalho, dignidade e honestidade. Obrigada, mamãe, por ser a pessoa mais forte, doce e amorosa que conheço. Obrigada por cuidarem tão bem do Antônio nas inúmeras vezes que precisei me ausentar! E por isso, eu também agradeço imensamente aos meus sogros, cunhados, tias e primas! Eu não conseguiria trabalhar com tranquilidade na execução desse projeto se ele não estivesse sendo cuidado com tanto amor por tantas pessoas especiais.

À Universidade Federal de Lavras, que foi minha segunda casa nos últimos dez anos! Quanto orgulho eu sinto por fazer parte dessa instituição! Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias pela acolhida. Aos colegas da pós graduação, com quem dividi inúmeras dores e delícias: Miguel, Du, Orlandi, Luiz Manoel, Laís, e também aos nossos estagiários! Obrigada pela dedicação na execução desse e tantos outros experimentos! O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, obrigada pelo apoio financeiro,

Aos grandes mestres com quem tive o prazer de aprender ao longo desses anos na UFLA. Por inúmeras vezes os ensinamentos foram muito além da sala de aula. Em especial, ao meu orientador, José Nélio, por ser um verdadeiro exemplo naquilo que faz, pela sua presteza em nos auxiliar sempre que necessário e por compreender a minha ausência em alguns momentos. Saio da Pós Graduação levando muito de você comigo. Aos membros da banca de avaliação, agradeço pelo empenho em fazer com que esse estudo se torne ainda mais completo e possa cumprir seu propósito de auxiliar na atividade agropecuária do nosso país.

Ao Régis, por gentilmente nos ceder sua fazenda e seus animais para a execução desse trabalho, além de tantas boas conversas nas nossas idas e vindas pela balsa. Ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA – USP, na pessoa do Professor Flávio Meirelles, pela parte laboratorial desse experimento. Agradeço de maneira especial ao pós-doc Tiago de Bem, que muito me auxiliou nas análises de PCR, cuidando de cada amostra como se fosse sua e quebrando a cabeça para juntos chegarmos a um melhor resultado. Agradeço também ao Professor Juliano Silveira, pelo auxílio durante as análises de PCR. Sua humildade e generosidade são admiráveis.

“É justo que muito custe o que muito vale.” - Santa Tereza D’ávila. Muito obrigada!

RESUMO

Atualmente a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) está bem estabelecida como biotécnica aplicada em programas reprodutivos. Protocolos de IATF foram desenvolvidos para promover o controle das funções luteal e folicular, o que resulta em taxas de sincronização aproximadamente de 85%, sendo menor em animais de baixo escore de condição corporal. O sucesso da IATF se deve, em partes, ao estímulo da progesterona exógena na pulsatilidade de GnRH e LH, o que possibilita a ovulação de um folículo pré-ovulatório no início do período pós-parto. Com isso, maiores taxas de prenhez tem sido encontradas em vacas zebuínas de pós-parto recente tratadas com progesterona injetável anteriormente ao início do protocolo de IATF. A progesterona atua nas áreas mais sensíveis do eixo hipotalâmico-hipofisário na liberação de GnRH e LH, favorece a expansão e diminui a apoptose das células do cumulus, no entanto, ainda não se sabe o porquê desse aumento na taxa de prenhez dos animais tratados previamente com esse hormônio. No atual estudo, vacas *Bos indicus* (N=30) foram tratadas com 150 mg de progesterona injetável dez dias antes (D-10) do protocolo de sincronização da ovulação (D0), a base de implante intravaginal de progesterona e benzoato de estradiol. Após cinco dias (D5), todos os folículos visíveis foram aspirados. Os COCs foram selecionados, classificados e os oócitos armazenados em nitrogênio líquido para posterior análise de PCR em tempo real, assim como as células do cumulus. Na PCR, genes de qualidade oocitária (BMP15 e GDF9), expansão das células do cumulus (HAS2) e de controle da apoptose (BAX e BCL2) foram analisados. Não houve diferença significativa na qualidade oocitária e na expressão relativa dos transcritos avaliados, demonstrando que a progesterona injetável não interfere na qualidade dos oócitos e no controle da apoptose e expansão das células do cumulus, não sendo essa a causa do aumento de prenhez nos animais tratados com esse hormônio.

Palavras-chave: IATF. Progesterona. Qualidade Oocitária. Células do Cumulus

ABSTRACT

Currently, Time Artificial Insemination (TAI) is well established as a biotech applied in reproductive programs. TAI protocols were developed to promote the control of luteal and follicular functions, which results in synchronization rates of approximately 85%, being lower in animals with a low body condition score. The success of TAI is due, in part, to the stimulation of exogenous progesterone in the pulsatility of GnRH and LH, which allows the ovulation of a preovulatory follicle in the beginning of the postpartum period. Higher pregnancy rates have been found in recent postpartum Zebu cows treated with injectable progesterone prior to TAI protocol. Progesterone acts in the most sensitive areas of the hypothalamic-pituitary axis in the GnRH and LH release, favors the expansion and decreases the apoptosis of cumulus cells, however, it is still unknown why this increase in the pregnancy rate of previously treated animals with this hormone. In the current study, *Bos indicus* cows (N=30) were treated with 150 mg of injectable progesterone ten days before (D-10) the ovulation synchronization protocol (D0), based on intravaginal progesterone implant and estradiol benzoate. After five days (D5), all visible follicles were aspirated. COCs were selected, classified and oocytes stored in liquid nitrogen for subsequent real-time PCR analysis, as well as cumulus cells. In PCR, oocyte quality (BMP15 and GDF9), cumulus cell expansion (HAS2) and apoptosis control (BAX and BCL2) genes were analyzed. There was no significant difference in oocyte quality and relative expression of the transcripts evaluated, demonstrating that injectable progesterone does not interfere in the quality of oocytes and in the control of apoptosis and expansion of cumulus cells, which is not the cause of increased pregnancy in treated animals with this hormone.

Keywords: TAI. Progesterone. Oocyte quality. Cumulus Cells

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Gene alvo, sequência dos primers (*forward* e *reverse*), tamanho do amplicon (pares de base – pb) e número de acesso dos primers usados para RT-qPCR nos oócitos e células do cumulus..... 53
- Tabela 2** Símbolo e função dos genes avaliados nos oócitos e células do cumulus no pós parto de múltíparas *Bos indicus*..... 54
- Tabela 3** Avaliação quantitativa e qualitativa (média±erro) de oócitos obtidos por aspiração folicular (OPU) em vacas *Bos indicus* (n=30) submetidas a protocolo de sincronização da ovulação no pós parto recente após a administração de 150 mg de P4 injetável..... 55

LISTA DE SIGLAS

AREG	Anfiregulina
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
BE	Benzoato de estradiol
BMP15	Proteína morfogenética óssea 15
BTC	Betacelulina
CL	Corpo lúteo
COC	Complexo Cumulus Oócito
CYP11A1	Enzima P450 de clivagem de colesterol em cadeia
CYP2C	Enzima Citocromo P450 2C
CYP3A4	Enzima Citocromo P450 3A4
CYP450	Citocromo P450
D	Dia
E ₂	Estrógeno
ECC	Escore de condição corporal
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPGN	Epígeno
EPM	Erro padrão da média
EREG	Epiregulina
FGF10	Fator de crescimento de fibroblasto 10
HAS2	Hialuronidade sintase 2
HB-EGF	Fator de crescimento epidermal ligado à heparina

hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HSD3B	Enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
i.m.	Intra muscular
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Acetato de medroxiprogsterona
MAPK/ERK	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
MII	Meiose II
MIV	Maturação in vitro
mL	Microlitros
MPF	Fator promotor de maturação
N	Número
ng	Nanogramas
NPPC	Peptídeo natriurético precursor C
NRG	Neuregulinas
P	Significância
P4	Progesterona
PGF	Prostaglandina F
PGRMC	Componente de membrana do receptor de progesterona
PKA	Proteína quinase A
P por IA	Prenhez por inseminação artificial
PR	Receptor de progesterona
PTGS2	Ciclo oxigenasse 2

Ptx3	Pentraxina 3
SAS	Statistical Analysis System
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogênica
TFG α	Fator de crescimento transformador
TNFAIP6	Proteína induzida por Fator de Necrose Tumoral 6
TNFR1	Fator de necrose tumoral 1
UI	Unidades internacionais
US	Ultrassom
VG	Vesícula Germinativa
vs	Versus

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. PROGESTERONA	16
2.1.1. Produção de P4	17
2.1.2. Metabolização da P4	18
2.1.3. Progesterona na reprodução animal	19
2.1.4. Progesterona Injetável	21
2.2. QUALIDADE OOCITÁRIA	22
2.2.1. Competência oocitária	22
2.1.2. Expressão de genes de qualidade oocitária e células do cumulus	25
2.3. PROGESTERONA NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E NA TAXA DE PREENHEZ	26
2.4. PROGESTERONA NA QUALIDADE OOCITÁRIA	29
2.4.1. Relação entre a progesterona e expansão das células do cumulus	30
2.4.2. Progesterona na maturação dos oócitos	30
2.4.3. Progesterona no desenvolvimento da competência oocitária	31
REFERÊNCIAS	33
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	45
ARTIGO Exposição prévia à progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação não interfere na qualidade oocitária e na expressão gênica de células do cumulus de vacas <i>Bos indicus</i> lactantes	45
Resumo	46
Abstract	47
Introdução	48
Material e métodos	49
Resultados	55
Discussão	57
REFERÊNCIAS	60

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A eficiente multiplicação de animais com características zootécnicas desejáveis por biotecnologias da reprodução pode proporcionar maior retorno econômico à agropecuária. Da mesma forma que elevados índices reprodutivos associados ao melhoramento genético devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançarem maior produtividade e lucratividade na pecuária. Programas de inseminação artificial (IA) após detecção de cio geram resultados satisfatórios em termos de taxa de concepção (DRANSFIELD *et al.*, 1998). No entanto, geralmente apresentam baixa taxa de prenhez devido à baixa taxa de serviço, associada frequentemente à dificuldade na detecção de cio.

O desenvolvimento de tratamentos hormonais que mimetizam o ciclo estral permitiram sincronizar o desenvolvimento folicular e a ovulação em bovinos (BARUSELLI *et al.*, 2012). Essa tecnologia permitiu o emprego da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que dispensa a necessidade de detecção do cio, tornando mais prático o uso dessa biotecnologia (BARUSELLI *et al.*, 2004; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Os protocolos de sincronização da ovulação a base de progesterona e estradiol estão bem estabelecidos (BARUSELLI *et al.*, 2017; SALES *et al.*, 2012), no entanto, a eficiência de sincronização é variável, atingindo aproximadamente 85% (SÁ FILHO, M. F. *et al.*, 2011; SALES *et al.*, 2016), sendo menores em vacas com baixo escore corporal ao início do protocolo (SÁ FILHO, O. G. *et al.*, 2009). A menor eficiência acontece devido à redução da pulsatilidade de LH e maior período de anestro pós-parto promovidos pelo estresse nutricional (DISKIN *et al.*, 2003), fêmea ainda em fase de crescimento (GRIMARD *et al.*, 1995) e a presença do bezerro (WILLIAMS *et al.*, 1983), gerando grande variação de resultados.

Os efeitos positivos dos protocolos de sincronização da ovulação em vacas em anestro se devem em parte ao estímulo da progesterona exógena (dispositivo intravaginal) na pulsatilidade de GnRH e LH (RHODES *et al.*, 2002), possibilitando a ovulação de um folículo no início do período pós-parto. A progesterona reduz o número de receptores de estradiol no hipotálamo responsável pelo feedback negativo na secreção de GnRH (ADAMS *et al.*, 1992; DAY, 2004; IRELAND; ROCHE, 1982). Além disso, a progesterona estimula a liberação de GnRH/LH por alterações na quantidade e no local (hipotálamo mediobasal) dos receptores de estrogênio no hipotálamo (BLACHE; BATAILLER; FABRE-NYS, 1994; CARATY;

SKINNER, 1999) e aumenta receptores de estrógeno nas regiões mais sensíveis de secreção de LH (BLACHE; BATAILLER; FABRE-NYS, 1994; BLACHE; FABRE-NYS; VENIER, 1991; CARATY; SKINNER, 1999). Ainda, a progesterona aumenta a sensibilidade dos receptores de estrógeno alfa em região crítica do hipotálamo responsável por induzir a liberação de GnRH (GÜMEN; WILTBANK, 2002). No entanto, altas concentrações de progesterona por períodos superiores a 10 dias resultam no desenvolvimento de folículos maiores e de maior duração em comparação com os padrões naturais de crescimento (DÍAZ *et al.*, 2015). Vacas com concentrações de progesterona sub-luteal desenvolvem persistência folicular devido à ausência de um pico de hormônio luteinizante pré-ovulatório (SHORT *et al.*, 1979). Assim, os oócitos provenientes de folículos persistentes tornam-se degenerados devido à ativação prematura (AHMAD *et al.*, 1996; REVAH; BUTLER, 1996).

Dessa forma, em vacas que não respondem ao protocolo de IATF, o período de exposição à progesterona durante o protocolo de IATF pode ser insuficiente para aumentar a pulsatilidade do LH necessária para a ovulação. Atualmente, sabe-se que a exposição à progesterona por dez dias antes do início do protocolo de sincronização da ovulação aumentou o diâmetro folicular ao início do protocolo e o risco de prenhez 1,7 vezes em vacas Nelore lactantes (SIMÕES *et al.*, 2018). Acredita-se que a maior fertilidade das vacas que receberam progesterona antes do protocolo de IATF seja devido a melhor qualidade oocitária adquirida durante o desenvolvimento oocitário, em função da adequada pulsatilidade de LH estimulada pela progesterona administrada. Isso porque o estágio final de crescimento do folículo dominante passa a ser dependente do LH, e não apenas do FSH (GINTHER, 2016), o que é coincidente com a aquisição da competência oocitária (SIRARD, MARC ANDRÉ, 2016). Além disso, maiores concentrações de progesterona durante o desvio folicular parecem influenciar na expressão de receptores de LH (MARTINEZ *et al.*, 2018).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PROGESTERONA

A progesterona (P4) junto com os corticosteroides, os estrógenos e os andrógenos são os hormônios que compõem à classe dos esteróides. Possui o nome químico Pregna-4-ene-3,20-diona, é produzida pelo córtex adrenal, gônadas e placenta. Esse progestágeno natural modula várias funções reprodutivas como o crescimento folicular, nutrição inicial do embrião (MANN;

LAMMING, 1999) e bloqueio da expressão do estro e ovulação por ação no hipotálamo (COLAZO *et al.*, 2008). A produção ocorre durante o ciclo estral normal seguido ou não de gestação por uma glândula transitória, o corpo lúteo (CL) (BALLAROTTI; SOUZA, 2013) e, sua função é preparar o endométrio para manter uma possível gestação. O ambiente uterino devidamente preparado pela P4 fornece as condições favoráveis para o desenvolvimento do concepto (BINELLI *et al.*, 2001).

As concentrações de P4 que atingem os receptores dentro de cada célula são os principais determinantes das ações fisiológicas de P4 em um animal (WILTBANK. *et al.*, 2011). A sua metabolização se dá por meio do sistema hepático e a nutrição tem papel importante na concentração circulante de progesterona (ALVES; PEREIRA; COELHO, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2013). Se a produção de P4 é aumentada por incremento no tecido lúteo sem mudança no fluxo sanguíneo hepático, então, a P4 circulante ficará maior. Por outro lado, se a produção de P4 for estável, um aumento no fluxo sanguíneo hepático poderá promover redução na P4 circulante (WILTBANK. *et al.*, 2011). As concentrações plasmáticas de progesterona dos bovinos apresentam variações durante o ciclo estral normal, com concentrações abaixo de 1ng/mL no estro e valores entre 2 e 4 ng/mL no diestro (ADEYEMO; HEATH, 1980; CASTILHO *et al.*, 2007; LAVON *et al.*, 2010; LÜTTGENAU *et al.*, 2011; SOLER *et al.*, 2015), essas concentrações são mantidas elevadas até o início da regressão do CL, caso não ocorra gestação.

A P4 está associada com o processo da ovulação e o estabelecimento e manutenção da prenhez (LEONHARDT; EDWARDS, 2002). Atua com frequência em sinergismo com o estrógeno (E2) e exerce várias funções no crescimento das glândulas endometriais e lobuloalveolar da glândula mamária, na atividade secretora do oviduto e das glândulas endometriais para fornecimento de nutrientes para o desenvolvimento do embrião antes da sua implantação, na inibição da contração uterina durante a gestação e na regulação da secreção de gonadotrofinas (SWENSON; REECE, 1996).

2.1.1 Produção de P4

O fator primordial da regulação das concentrações circulantes de P4 é a sua produção endógena. O CL é o principal tecido no organismo que produz P4 em vacas no início do ciclo estral normal seguido ou não de prenhez. Sua produção a partir do colesterol envolve a atividade

de duas principais enzimas e uma proteína carreadora. A primeira enzima é conhecida como enzima P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CYP11A1), que se localiza no interior das membranas mitocondriais e convertem o colesterol em pregnenolona. A pregnenolona por sua vez é convertida em P4 pela ação da enzima 3B-hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3B), localizada no retículo endoplasmático das células. Entretanto, para que isto ocorra, o colesterol precisa ser carregado através das membranas mitocondriais. O movimento do colesterol para dentro da membrana mitocondrial é mediado por mecanismo de transporte regulado pela produção de uma proteína de transporte, a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR). Em síntese, o mecanismo para a síntese de P4 a partir do colesterol envolve o transporte do colesterol para dentro da membrana mitocondrial pela StAR, conversão do colesterol a pregnenolona pela CYP11A1 e, finalmente, pela conversão da pregnenolona a P4 pela HSD3B (BALLAROTTI; SOUZA, 2013).

Apesar do crescimento do CL ser a principal razão para o aumento da P4 circulante durante o início do ciclo estral, não há relação precisa entre o tamanho do CL e a produção de P4. Essa falta de precisão entre tamanho de CL e concentração de P4, ocorre devido a diferenças metabólicas de diferentes categorias animais. Além disso, a regressão do CL tem redução mais precoce na produção de P4 do que na diminuição do seu tamanho. Portanto, um CL com tamanho substancial pode ser associado a uma baixa concentração de P4 no fim do ciclo estral (BALLAROTTI; SOUZA, 2013).

O CL funcional tem alta produção de P4 por unidade de tecido luteal com taxas ao redor de 10^{16} moléculas de P4 produzidas por grama de tecido (JANSON; DAMBER; AXEN, 1981). Essa alta taxa de produção de P4 pelo CL se deve principalmente, a dois fatores. Primeiro, pela existência de elevada quantidade de colesterol disponível para o CL devido à alta concentração sanguínea de lipoproteínas de alta densidade (HDL) nos ruminantes. Esse HDL está prontamente disponível para ser utilizado pelo CL, que é provido por elevado fluxo sanguíneo. Segundo, as duas enzimas essenciais para a produção de P4, CYP11A1 e HSD3B, somadas a proteína carreadora StAR estão disponíveis em grandes quantidade no CL. Esses componentes enzimáticos necessários para produção de P4 aumentam rapidamente após a luteinização do folículo e desenvolvimento luteal (DIAZ *et al.*, 2002).

2.1.2 Metabolização da P4

As concentrações circulantes de P4 representam equilíbrio entre a produção, principalmente pelo corpo lúteo, e o metabolismo, principalmente pelo fígado. O mecanismo fisiológico relacionado à redução da circulação da P4 parece relativamente simples (WILTBANK, M. *et al.*, 2006). Todo metabolismo da P4 ocorre no fígado, sendo assim, qualquer aumento na produção de P4 também corresponde a aumento na taxa de metabolismo hepático. O fluxo sanguíneo que passa pelo fígado é proveniente de dois principais vasos, a artéria hepática e a veia porta. A veia porta contém quase todo o sangue proveniente do trato digestivo. Qualquer aumento no fluxo sanguíneo do trato digestivo, irá necessariamente aumentar o fluxo sanguíneo pela veia porta e conseqüentemente, irá aumentar a taxa de metabolismo da P4 pelo aumento da passagem desse hormônio (e sendo metabolizada) pelo fígado (SANGSRITAVONG *et al.*, 2002).

O metabolismo da P4 geralmente envolve a hidroxilação das enzimas CYP-450 (a CYP3A4 é a enzima mais abundante no fígado) ou redução pelo mecanismo 5-alfa redutase (SANGSRITAVONG *et al.*, 2002). O mecanismo mais comum de metabolização da P4 é pela 6-beta hidroxilação (MURRAY, 1991) ou 21-hidroxilação (MURRAY, 1992). Entretanto, os metabólitos de P4 mais encontrados no sangue, nas fezes e na urina são as pregnanas 5-alfa e 5-beta reduzidas, indicando que o mecanismo de redutase é o maior responsável pelo metabolismo da P4 *in vivo*. A insulina parece ser o maior inibidor da expressão de genes e de proteínas de duas das principais enzimas P-450 (CYP3A e CYP2C) envolvidas no metabolismo hepático da P4 de ovinos e de bovinos (LARSON; KRISHER; LAMB, 2011; SMITH *et al.*, 2006).

2.1.3 Progesterona na reprodução animal

A progesterona e os progestágenos podem ser administrados de diferentes modos na reprodução: por meio de esponjas impregnadas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou progesterona natural (P4); implantes subcutâneos com norgestomet; dispositivos intravaginais de silicone com liberação lenta de progesterona natural ou progesterona injetável. Sua utilização inicia-se na década de 50 e com o desenvolvimento de tratamentos hormonais para sincronização da ovulação, seu uso tornou-se bastante difundido na manejo reprodutivo de bovinos (TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2009). Vários protocolos de sincronização foram desenvolvidos (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995), buscando as melhores taxas de

concepção e melhores formas de utilização tanto em vacas de corte (BARUSELLI *et al.*, 2006; GONÇALVES; VIANA, 2019) quanto em vacas de leite (SOUZA *et al.*, 2009). Inicialmente, os progestágenos eram constituídos por implante hidrônico subcutâneo de norgestomet (6 mg) (Sycromate B®) (WILTBANK; GONZALES-PADILLA., 1975). Posteriormente, outro dispositivo semelhante foi lançado, porém, com tecnologia diferenciada, em que o progestágeno foi impregnado em silicone, resultando em liberação mais constante do produto (KESLER; FAVERO; TROXEL, 1995). Atualmente, a forma mais utilizada são os dispositivos intravaginais de liberação de progesterona, contendo de 0,6 a 1,9g de P4 (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003).

Com a finalidade de melhorar a eficiência reprodutiva em sistemas pecuários de criação de gado de corte e leite, os protocolos hormonais são rotineiramente utilizados, a fim de induzir o retorno a ciclicidade em fêmeas bovinas no pós-parto e aumentar a eficiência reprodutiva (BÓ; BARUSELLI, 2014). Inicialmente para sincronizar o estro em bovinos, usava-se progestágenos por prevenir a ocorrência de cio e a ovulação. A concentração elevada de P4 exógena limita o crescimento folicular (TAYLOR; RAJAMAHENDRAN, 1994) e pode causar atresia do folículo persistente (STOCK; FORTUNE, 1993). Quando administrados em combinação, o E2 intensifica a capacidade da P4 na supressão do LH circulante (STUMPF *et al.*, 1993). A elevação da P4 no plasma devido à inserção do dispositivo intravaginal de progesterona induziu a supressão transitória de LH por aproximadamente 48h e a administração do benzoato de estradiol potencializou o efeito da P4, prolongando o período de supressão do LH. Após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, a subsequente recuperação do LH coincide com o declínio das concentrações da P4 (BURKE; MACMILLAN; BOLAND, 1996). Assim, a associação de ésteres de estradiol e implantes de P4, administrados simultaneamente, promovem a emergência de uma nova onda folicular entre o terceiro e o quarto dia após a administração (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003).

Além do uso da P4 nos protocolos de IATF, várias estratégias anti-luteolíticas têm sido utilizadas para aumentar a qualidade embrionária e os índices gestacionais (BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, 2001; FAIR; LONERGAN, 2012). Estratégias que visam estimular o aumento do folículo ovulatório, formação de um CL acessório e suplementação com progesterona exógena em diferentes momentos foram desenvolvidas (BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, 2001). Apesar dos indicativos do efeito benéfico do aumento das concentrações de P4 no desenvolvimento embrionário em bovinos, os resultados de fertilidade desses estudos são comumente

conflitantes e inconclusivos (FAIR; LONERGAN, 2012). Outras estratégias empregadas são a formação de CL acessórios por meio de aplicações de GnRH e suplementação com P4 injetável (MACHADO et al., 2006). A suplementação injetável de P4 também tem sido uma estratégia muito empregada pelos grupos de pesquisas e os resultados apontam que a concentração e o momento da aplicação da P4 são importantes no incremento nas taxas de gestações (BINELLI et al., 2001; SIMÕES et al., 2018).

2.1.4 Progesterona Injetável

O uso da progesterona injetável de longa ação tem sido reportado em estudos como forma alternativa de suplementação de P4 por ser prático e diminuir o manuseio com os animais. A demanda para o desenvolvimento de formulação de progesterona de longa ação em veículo biodegradável para uso nas espécies domésticas é crescente (RATHBONE *et al.*, 1998). Foi demonstrado que uma única aplicação intramuscular de um produto à base de progesterona, em microesferas biodegradáveis, possibilita controlar a ovulação e manter a concentração sérica desejável de progesterona por dias ou meses (BLANCHARD *et al.*, 1992).

A P4 injetável de longa ação, é uma progesterona natural de liberação lenta, na concentração de 150 mg/mL. Sua ação em vacas sem a presença de CL e pré- sincronizadas, foi suficiente para manter as concentrações de progesterona acima de 1 ng/mL, por pelo menos 7 dias (SIMÕES *et al.*, 2018). Em novilhas Angus e Simental, observou-se que após administração de 625 mg de P4 injetável em preparação de microesferas, as concentrações de P4 mantiveram-se elevadas por 12-13 dias, com pico de até 5 ng/mL nas concentrações de P4 (WHISNANT; BURNS, 2002). Em bezerras Nelore e mestiças após a administração de doses de 450 e 750 mg de P4 injetável verificou-se concentração média de progesterona circulante de 2,87 ng/mL e valores máximos entre 5 e 6 ng/mL (LIMA *et al.*, 2007). Em outro estudo, observou-se concentração máxima de 3,8 ng/mL após a administração de 150 mg de P4 injetável em vacas Nelore primíparas (SIMÕES *et al.*, 2018). Além disso, observou-se aumento das concentrações séricas de P4 nas primeiras 24 horas após o tratamento. Posteriormente foi observada diminuição gradual nas concentrações circulantes até 168h, permanecendo acima de 1,5 ng/mL por até sete dias. De forma semelhante, alguns autores (CARVALHO *et al.*, 2020), verificaram que após administração de diferentes doses de P4 injetável (60 mg, 105 mg, 150 mg, 195mg e 240 mg) em vacas Nelore lactantes, o pico nas concentrações foi observado nas primeiras 24 após após a administração do fármaco. No entanto, o grupo de 105mg obteve

concentrações abaixo de 1 ng/mL no segundo dia, enquanto os demais grupos apresentaram baixa concentração do hormônio no terceiro dia após a administração.

Em parâmetros reprodutivos, a utilização da progesterona injetável de longa ação em momentos pós-inseminação tanto em animais de leite (LARA et al., 2020) quanto de corte (PUGLIESI *et al.*, 2016), foram avaliadas, (PUGLIESI *et al.*, 2016) assim como anterior ao protocolo de IATF em vacas de corte (SIMÕES *et al.*, 2018). A administração de 150mg de P4i previamente ao protocolo de sincronização da ovulação aumentou a taxa de prenhez em vacas Nelore (SIMÕES et al., 2018), aumentando também o diâmetro do folículo dominante em D8. Também foi observado aumento na taxa de prenhez quando a administração de 150mg de P4i foi realizada quatro dias após a IATF (PUGLIESI et al., 2016). No entanto, menor fertilidade foi encontrada em vacas holandesas de alta produção quando 300mg de P4i foi utilizada no início do protocolo de sincronização da ovulação (LARA et al., 2020). Em relação a utilização de P4i em substituição ao dispositivo intravaginal de P4, que é a fonte majoritariamente utilizada em protocolos de sincronização da ovulação, são poucos os estudos realizados. Menor taxa de ovulação foi encontrada após o tratamento com 350mg de P4 injetável quando comparada ao grupo que foi inserido o dispositivo intravaginal (MOROTTI *et al.*, 2018). Além disso, menor taxa de prenhez foi relatada em vacas de corte utilizando esta mesma dose (MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013). No entanto, taxa de prenhez semelhante foi observada em protocolos iniciados com o dispositivo intravaginal ou 250mg de P4i (CAMPOS *et al.*, 2016).

2.2 QUALIDADE OOCITÁRIA

2.2.1 Competência oocitária

Sabe-se que a fertilidade das fêmeas é em grande extensão determinada pela qualidade do oócito, a qual é refletida na sua habilidade de progredir para meiose, ser fertilizado e possibilitar o desenvolvimento de um embrião viável. Os estudos da expressão de fatores secretados localmente pelos oócitos e pelas células do cumulus são essenciais para o entendimento adequado da maturação oocitária (SIRARD, MARC ANDRÉ *et al.*, 2006).

Competência oocitária se refere à capacidade do oócito completar a divisão meiótica, garantir fecundação monospérmica, descondensar a cabeça do espermatozoide, transpor a

transição materno-zigótica e prosseguir seu desenvolvimento (COTICCHIO *et al.*, 2004). Para que essa competência seja adquirida, o acúmulo de RNAm estocados durante o crescimento e fase final do desenvolvimento folicular precisa ser adequado (SIRARD, M. A., 2001; SIRARD, MARC ANDRÉ *et al.*, 2006). Para garantir o status de “capacidade de desenvolvimento oocitário”, o complexo cumulus oócito (COC) deve passar por uma série de fenômenos bioquímicos e correlatos envolvendo as células germinativas e somáticas, como a maturação oocitária nuclear e citoplasmática (SIRARD, M. A., 2001).

A maturação oocitária se caracteriza por transformações no núcleo e no citoplasma do oócito que ocorrem durante a sua progressão da prófase I até o estágio de metáfase II (SIRARD, M. A., 2001). Uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações ocorre envolvendo várias proteínas que participam do reinício e da regulação da meiose durante a maturação oocitária. Somente oócitos competentes têm capacidade de alcançar a completa maturação, ser fecundado e formar um embrião que seja apto a manter a gestação (FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006; SIRARD, MARC ANDRÉ *et al.*, 2006).

As alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem durante a maturação podem ser divididas em maturação nuclear, citoplasmática e molecular (MERMILLOD *et al.*, 2000). A maturação nuclear se inicia quando o oócito retoma a meiose saindo do estágio de vesícula germinativa (VG) e termina quando atinge a meiose II (MII). A maturação citoplasmática compreende todas as alterações estruturais e reorganização das organelas citoplasmáticas. Já a maturação molecular controla a nuclear e a citoplasmática, e está envolvida na síntese de proteínas e armazenamento de RNAm (SIRARD, M. A., 2001).

Os oócitos de mamíferos são produzidos desde a vida fetal e ficam retidos em prófase I da primeira divisão meiótica até a ovulação. A maturação nuclear dos oócitos compreende um ciclo em que o núcleo sai do estágio de prófase I e progride para a MII da meiose sendo que a retomada da meiose *in vivo* ocorre após o pico de LH, e *in vitro*, espontaneamente após a retirada dos oócitos do ambiente folicular (LONERGAN *et al.*, 1994; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Na maturação nuclear *in vivo*, a liberação do LH não atua diretamente no oócito, visto que esse não apresenta receptores para essa gonadotrofina. Sua ação é mediada por fatores parácrinos secretados pelas células somáticas responsivas ao LH (células da granulosa), e pelo transporte de substâncias indutoras da meiose das células da granulosa/cumulus para os oócitos por meio das junções “Gap” (GILULA; EPSTEIN; BEERS, 1978). A retomada da meiose é atribuída à interrupção da transferência de fatores inibidores da maturação do oócito, decorrente da expansão das células do cumulus com consequente perda da comunicação intercelular entre os COCs e as células da granulosa murais do folículo

(DEKEL, 1996). Essa expansão é promovida pela produção de ácido hialurônico produzido pelas células do cumulus. A expansão é dependente da estimulação de peptídeos semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-like) induzidos por LH, pela ativação da proteína quinase A (PKA) e em resposta a altas concentrações de Adenosina 3'-5' Monofosfato cíclico (AMPC) produzidas pelas camadas externas das células da granulosa (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Por esses estímulos, os níveis da transcrição dos genes que estão envolvidos na expansão das células do cumulus aumentam, como síntese de ácido hialurônico 2 (Has2), proteína relacionada a pentraxina (Ptx3) e proteína induzida por TNF alfa 6 (Tnfaip6) (ASHKENAZI *et al.*, 2005; OCHSNER *et al.*, 2003). Além do mais, quando os fatores EGF-like são liberados, ativam seus receptores (EGFR) nas células da granulosa e do cumulus e a via MAPK/ERK estimulam a retomada da meiose (FREIMANN *et al.*, 2004).

A família do fator de crescimento epidermal (EGF) compreende 11 proteínas, incluindo EGF, fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina (HB-EGF), fator de crescimento transformador- α (TGF α), epígeno (EPGN), neuregulinas 1 a 4 (NRG1-4), anfiregulina (AREG), epiregulina (EREG) e betacelulina (BTC), todos esses fatores possuem propriedades estruturais e funcionais (SCHNEIDER; WOLF, 2009), influenciando os mais variados eventos biológicos relacionados à fisiologia ovariana em mamíferos, como proliferação de células da granulosa, esteroidogênese e maturação de oócitos. Parte da função da rede EGF é induzir a expansão do cumulus, um processo pelo qual as células do cumulus secretam e estruturam uma matriz rica em ácido hialurônico que facilita a ovulação, penetração e fertilização espermática (RICHANI; GILCHRIST, 2018). Os peptídeos do tipo EGF induzem a expressão temporal de RNAm a partir de genes necessários para a formação da matriz cumulus (Has2, Ptx3, Tnfaip6) *in vitro* em folículos pré-ovulatórios e de células do cumulus (ASHKENAZI *et al.*, 2005; RICHANI; GILCHRIST, 2018), o que facilita a expansão.

Para que o reinício da meiose aconteça e a progressão da maturação ocorra em oócitos de diversas espécies de mamíferos é necessária a síntese e ativação de várias proteínas já descobertas atualmente. Resumidamente, esse processo é regulado pela fosforilação e desfosforilação proteica, mediada pelas proteínas quinases e fosfatases, respectivamente (WEHREND; MEINECKE, 2001). As principais moléculas que estão envolvidas no controle do bloqueio meiótico são o AMPC, monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), peptídeo natriurético precursor C (NPPC), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fator promotor de maturação (MPF).

2.2.2 Expressão de genes de qualidade oocitária e células do cumulus

A capacidade de desenvolvimento oocitário pode estar relacionada com a presença ou quantidade de genes específicos expressos durante o desenvolvimento inicial do oócito (BILODEAU-GOESEELS, 2003). Assim, a qualidade do oócito pode correlacionar-se com a prevalência ou não de genes transcritos (SCHULTZ, 1993).

Dois importantes fatores secretados pelo oócito são o fator de crescimento diferencial 9 (GDF9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15), os quais ativam vias sinalizadoras nas células do *cumulus* para regular genes chaves e processos celulares importantes para diferenciação e para manutenção de seu próprio fenótipo (GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008). Um estudo evidenciou que BMP15 e FGF10 aumentaram a expansão do cumulus *in vitro* pela modulação da abundância de mRNA de ciclo oxigenase (*PTGS2*) ou genes correlatos e que ambos os fatores aumentaram o metabolismo de glicose pela via da hexosamina (CAIXETA *et al.*, 2013). Esses dados reforçam a importância desses fatores na maturação e, conseqüentemente, na competência oocitária de desenvolvimento. Além disso, deficiências na secreção de GDF9 e BMP15 pelo oócito resultam em desenvolvimento folicular anormal e infertilidade (DONG *et al.*, 1996; GALLOWAY *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2001).

A qualidade oocitária também pode ser avaliada pela relação entre o oócito e as células do cumulus. O cumulus é um grupo de células da granulosa que mantém íntimo contato com o oócito por meio das junções do tipo *gap* (GILCHRIST *et al.*, 2004; CANIPARI *et al.*, 2000). Sob estímulo da onda pré-ovulatória de LH (*in vivo*) e pela suplementação de FSH ao meio de maturação (*n vitro*), o oócito reinicia a meiose e as células do cumulus secretam uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico, a qual promove aumento de volume do complexo cumulus-oócito caracterizando o processo de expansão do cumulus (ISOBE; MAEDA; TERADA, 1998; TANGHE *et al.*, 2002). A expansão das células do cumulus relaciona-se positivamente com a maturação oocitária e fertilização (TANGHE *et al.*, 2002) e a expressão de genes específicos (*HAS2*, *PTX3* e *TNFAIP6*) determinam a capacidade de expansão dessas células (FÜLÖP *et al.*, 1997; GEBHARDT *et al.*, 2011; PANGAS; JORGEZ; MATZUK, 2004; SHIMADA *et al.*, 2006). O gene *HAS2* (*hyaluronan synthase 2*) é responsável pela síntese de ácido hialurônico pelas células do cumulus que promove a expansão da matriz extracelular (IRVING-RODGERS; RODGERS, 2005; SCHOENFELDER; EINSPANIER, 2003). Os níveis de *HAS2* também interferem na competência do oócito (DUNNING *et al.*, 2007)(DUNNING *et al.*, 2007). Assim, esses e outros genes expressos pelas células do cumulus

tanto refletem como determinam a interação cumulus/oócito e cumulus/embrião inicial (RUSSELL; ROBKER, 2007).

A apoptose é um processo de morte celular ativo (FRANCO; CIDLOWSKI, 2009), que pode ser iniciado por duas vias distintas: extrínseca e intrínseca. A via intrínseca tem como característica a liberação de fatores pró apoptóticos, tais como o citocromo c, pela mitocôndria. O citocromo c livre no citosol ativa caspases, ocasionando proteólise e morte celular. Já a via extrínseca é desencadeada pela relação de alguns ligantes a receptores de morte na superfície celular, como o receptor do fator de necrose tumoral I (TNFR1), induzindo o recrutamento e a ativação de caspase e ativação da BAX, desencadeando a liberação de fatores apoptóticos pela mitocôndria. Por outro lado, existem outras proteínas conhecidas como anti-apoptóticas, como a BCL2, que antagonizam esses efeitos (ZONG *et al.*, 2001) por meio de um bloqueio da ação de BAX e BAK, mantendo a integridade da membrana mitocondrial (PERCIAVALLE *et al.*, 2012). Os COCs são controlados por vários mecanismos apoptóticos (TILLY, 1996). As células apoptóticas do cumulus podem influenciar negativamente a maturação nuclear, citoplasmática e o desenvolvimento durante a pré-implantação do embrião (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). A família do gene BCL2 (B cell leukemia/lymphoma 2) é uma das reguladoras centrais da apoptose. Essa família pode ser composta por proteínas pró-apoptóticas, como a BAX (BCL2 associated X protein) e anti-apoptóticas, como a BCL2 (GROSS; MCDONNELL; KORSMEYER, 1999). A relação BAX/BCL2 determina a susceptibilidade da célula a apoptose (OLTVAI; MILKMAN; KORSMEYER, 1993). Oócitos em grau I e blastocistos possuem maior expressão de BCL2 do que de BAX (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002).

2.3 PROGESTERONA NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E NA TAXA DE PREENHEZ

A progesterona pode afetar a qualidade do oócito por meio de seu efeito no desenvolvimento do folículo dominante e sabe-se que isso tem uma relação direta com a competência oocitária (KAUFFOLD *et al.*, 2005; LONERGAN *et al.*, 1994). A frequência de secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é regulada pelas concentrações circulantes de P4 durante o ciclo estral, que por sua vez regula a frequência de pulso de LH. A frequência de pulso de LH é o principal fator que determina se um folículo dominante ovula ou não (ROCHE, 2006). Nesse sentido, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliar a influência da P4 na dinâmica folicular e nas taxas de prenhez (RIVERA *et al.*, 2011; SIMÕES *et al.*, 2018).

Simões et al. (2018) avaliaram a influência da progesterona injetável prévia ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo sobre o crescimento folicular de vacas *Bos indicus* lactantes. Esses autores observaram maior diâmetro do folículo dominante aos dez (D0 no protocolo de IATF) e aos dezoito dias após o tratamento com P4 injetável (D8 do protocolo da IATF), sugerindo possível papel da P4 na competência oocitária.

Um estudo em vacas superestimuladas demonstrou que P4 alta durante a superestimulação aumenta a qualidade subsequente dos embriões coletados no dia 7 após o estro da superovulação (RIVERA *et al.*, 2011). As vacas foram superestimuladas durante a primeira onda folicular (baixa P4), durante a segunda onda folicular (alta P4) ou durante a primeira onda folicular com suplementação de P4 usando dois dispositivos liberadores de progesterona para aumentar as concentrações de P4. Embora as estruturas totais que foram coletadas (embriões e oócitos) não tenham diferido entre os grupos, a porcentagem de embriões transferíveis foi menor nas vacas superestimuladas durante a primeira onda folicular (55,9%), em comparação a segunda onda folicular (88,5 %) ou primeira onda folicular com suplementação de P4 (78,6%). Da mesma forma, verificou-se maior número de embriões transferíveis em bovinos de corte quando P4 foi suplementada durante a superestimulação da primeira onda folicular (NASSER *et al.*, 2011). Em outro estudo foi demonstrado a importância da P4 elevada durante o crescimento da onda folicular final (ovulatória) (BISINOTTO; CHEBEL; SANTOS, 2010).

A competência oocitária pode estar correlacionada com a capacidade intrínseca do oócito de retomar e realizar a meiose, suportar a fecundação, permitir o desenvolvimento do embrião e gerar um produto final saudável, assim, considerar a taxa de prenhez pode ser uma maneira de avaliar a capacidade de desenvolvimento do oócito *in vivo* (GILCHRIST, 2011; SIRARD, MARC ANDRÉ *et al.*, 2006). Nesse sentido, Fonseca et al. foram um dos primeiros a relatar que vacas leiteiras gestantes tinham maiores concentrações de P4 em um intervalo de 12 dias antes da IA em comparação com vacas não gestantes (FONSECA *et al.*, 1983). Dois estudos foram realizados nos quais o efeito da P4 durante o protocolo Ovsynch foi avaliado. No primeiro estudo, as vacas foram avaliadas quanto à concentração de P4 no momento do primeiro GnRH do protocolo Ovsynch e 7 dias antes desse primeiro GnRH. As vacas foram classificadas como anovulares ou como Ovsynch inicial com P4 alta ou P4 baixa. Vacas cíclicas que iniciaram o Ovsynch com alta P4 tiveram maior número de gestações por IA (P/IA = 43,0%) do que vacas que tiveram baixa P4 (31,3%) ou que estavam anovulares (29,7%) no momento do início do Ovsynch. No segundo estudo, as vacas foram pré-sincronizadas com

duas prostaglandinas (PGF) e o Ovsynch foi iniciado 3 ou 10 dias após a segunda PGF com o objetivo de conseguir que as vacas ovulassem o folículo dominante da primeira ou da segunda onda folicular próximo à IATF. Semelhante ao primeiro estudo, vacas que ovularam na segunda onda folicular (altas concentrações de P4) apresentaram P/IA maior do que vacas que ovularam na primeira onda folicular (baixo P4; 41,7% vs 30,4%; BISINOTTO; CHEBEL; SANTOS, 2010). Da mesma forma, Simões et al (2018) também encontraram maior taxa de prenhez em vacas *Bos indicus* que receberam 150 mg de P4 injetável anterior ao protocolo de IATF (controle 35% vs P4i 45,9%). Assim, parece claro que o aumento da P4 durante o crescimento do folículo ovulatório aumenta a fertilidade para a IATF subsequente. Por outro lado, outros autores avaliaram os efeitos de concentrações variáveis de progesterona durante o desenvolvimento do folículo em vacas leiteiras em lactação não estimuladas (ovulação única) na dinâmica folicular, fertilização e qualidade do embrião. A redução das concentrações de progesterona durante o programa de sincronização alterou as concentrações de estradiol e a dinâmica folicular, mas resultou em fertilização semelhante e pequenas alterações na qualidade do embrião. Da mesma forma, o diâmetro do folículo dominante e as taxas de prenhez não diferiram em vacas de corte que foram inicialmente pressincronizadas com GnRH e implante de progesterona (CIDR) e posteriormente divididas em grupos com baixa ou alta P4 (CIDR usado mais PGF2 α vs CIDR novo mais CL), embora as concentrações de estradiol tenham sido maiores no grupo de baixa P4 (ABREU; GEARY; *et al.*, 2018). Portanto, o efeito da P4 elevada durante o crescimento do folículo dominante ainda é controverso.

Embora com resultados divergentes, acredita-se que a maior fertilidade das vacas com alta progesterona seja devido a melhor qualidade oocitária adquirida durante o desenvolvimento oocitário, em função da adequada pulsatilidade de LH estimulada pela progesterona administrada. No desenvolvimento folicular, as células da granulosa do maior folículo adquirem receptores de LH e passam a ter o crescimento dependente do estímulo dessa gonadotrofina, não sendo mais somente estimulado pelo FSH (GINTHER, 2016). Durante esse período de independência de FSH, o potencial de desenvolvimento oocitário é rapidamente aumentado, sendo importante para a aquisição da competência oocitária (SIRARD, MARC ANDRÉ, 2016). Além disso, em outro estudo observou-se que a permanência da progesterona durante o desvio folicular induziu maior expressão de receptores de LH no folículo pré-ovulatório, demonstrando possível efeito da progesterona na expressão de genes relacionado ao crescimento folicular (MARTINEZ *et al.*, 2018).

2.4 PROGESTERONA NA QUALIDADE OOCITÁRIA

O papel central da progesterona no estabelecimento da receptividade uterina em mamíferos, já foi bem descrito (BAZER et al., 2011). No entanto, o papel da P4 na maturação do oócito de mamíferos e seu potencial impacto na qualidade do oócito ainda não foram bem definidos (FAIR; LONERGAN, 2012) e apresentam resultados conflitantes.

Em relação à qualidade oocitária, diferentes concentrações de P4 durante o desenvolvimento folicular inicial não interferiram no número de folículos aspirados por vaca, no total de oócitos recuperados, na taxa de recuperação, na porcentagem de oócitos nos graus de 1 a 3 e no diâmetro do oócito (ABREU *et al.*, 2018). No entanto, o número de oócitos recuperados por aspiração, oócitos de melhor qualidade (grau I e II), taxa de clivagem embrionária e desenvolvimento embrionário nos estágios de 8 e 16 células foi maior em vacas *Bos indicus* cíclicas (que possuíam CL em um ou nos dois ovários) quando comparadas com vacas não cíclicas (SAAD *et al.*, 2019).

Embora com resultados controversos, várias evidências demonstram papel da P4 na maturação do oócito. A P4 elevada durante o desenvolvimento do folículo ovulatório incrementou a taxa de concepção (WILTBANK, M. C. *et al.*, 2012). Paralelamente, a mudança da dominância de estradiol (E2) para P4 no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios (entre o pico de LH e a ovulação) (DIELEMAN *et al.*, 1983) coincide com a retomada da meiose e maturação do oócito. Além disso, as células do cumulus exibem receptores para P4 e secretam P4 durante a maturação *in vitro*; e houve redução do desenvolvimento embrionário *in vitro* quando produção de P4 foi inibida (APARICIO *et al.*, 2011).

Na avaliação intracelular, foram encontrados receptores de progesterona genômicos e não-genômicos em COCs bovinos. Além disso, mudanças dinâmicas foram observadas na expressão proteica de receptores de progesterona após a maturação *in vitro* ou em resposta à suplementação com LH, FSH ou P4. Esses achados sugerem papel importante da P4 durante a maturação de oócitos bovinos. A inibição da síntese de P4 por células do cumulus ou o bloqueio da atividade de receptores de progesterona reduziu o desenvolvimento embrionário bovino, indicando que a sinalização intracelular da P4 é mediada por sua interação com receptores de progesterona nucleares e de membrana, sendo importante para o desenvolvimento da competência oocitária (APARICIO *et al.*, 2011).

2.4.1 Relação entre a progesterona e expansão das células do cumulus

As células do cumulus respondem ao pico de LH ovulatório com padrão único de indução gênica levando à expansão do cumulus (RUSSELL; ROBKER, 2007). A relação entre as células do cumulus e os oócitos é importante para a sua maturação citoplasmática e subsequente desenvolvimento da competência oocitária (ALI; SIRARD, 2005). Diferente do que já foi descrito em camundongos, que indicam que os receptores de progesterona não são normalmente expressos nas células do cumulus e a expansão dessas células não foi afetada em camundongos sem receptores de progesterona, a inibição da síntese de P4 ou o bloqueio dos receptores de P4 reduziu a expansão do cumulus durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos (APARICIO *et al.*, 2011). Da mesma forma, o bloqueio da expressão da isoforma beta do receptor de membrana de progesterona durante a maturação *in vitro* prejudicou a expansão do cumulus em COCs suínos (QIU *et al.*, 2008).

A expressão dos genes da matriz extracelular das células do cumulus e a expansão das células do cumulus são ativadas por sinalização ERK, pela ligação do EGF-Like (AREG, EREG e BTC) aos seus receptores (EGFR). Ambos os níveis de RNAm de AREG e EREG e seus níveis de proteína foram reduzidos significativamente em COCs de ovários coletados de camundongos sem receptores de P4, reforçando a ideia da importância da P4 na expansão das células do cumulus. Em suínos, verificou-se papel significativo da P4 na indução e manutenção de TACE/ADAM17, uma protease que é necessária para a produção de formas maduras de AREG e EREG (YAMASHITA *et al.*, 2010). Assim, parece que P4 e receptores de progesterona atuam ativamente na sinalização ERK induzida por EGFR, necessária para a expansão celular do cúmulus e maturação do oócito durante o processo de ovulação (YAMASHITA *et al.*, 2010).

2.4.2 Progesterona na maturação dos oócitos

Apesar do papel crítico da P4 no desencadeamento da maturação de oócitos de rãs e peixes, a importância da sinalização P4 e de receptores de progesterona para a maturação de oócitos de mamíferos *in vitro* ainda não está definida. A adição de P4 ao meio de cultura durante a maturação de oócitos bovinos *in vitro* reduziu a proporção de blastocistos (SILVA, 2000). No entanto, a mudança da dominância do estradiol para a dominância de P4 no fluido folicular dos folículos pré-ovulatórios de mamíferos no período entre o pico de LH e a ovulação (DIELEMAN *et al.*, 1983) e a síntese de P4 pelas células cúmulus durante a MIV (APARICIO

et al., 2011; SALHAB *et al.*, 2011) coincidente com a retomada da meiose e maturação do oócito, sugerindo alguma contribuição da P4 nesse processo (FAIR; LONERGAN, 2012).

Em bovinos, a P4 induz a transcrição de genes e afeta a competência oocitária, sinalizado por receptores nucleares e de membrana (APARICIO *et al.*, 2011). Os COCs bovinos expressam receptores de P4 nucleares (PR-A, PR-B), ligados à membrana (mPR α , mPR β), e componente da membrana do receptor de progesterona (PGRMC 1 e PGRMC2) (APARICIO *et al.*, 2011). Além disso, a expressão proteica desses receptores muda dinamicamente após a maturação *in vitro* em resposta ao LH, FSH ou P4 (APARICIO *et al.*, 2011). Experimentos inibitórios adicionais confirmaram a relevância funcional da sinalização da P4 e de receptor de progesterona durante a maturação do oócito para a aquisição da competência do oócito. A síntese de P4 e a sinalização de receptores de progesterona por COCs bovinos durante a MIV parecem não ser importantes para a maturação do oócito ou divisões de clivagem inicial (LUCIANO *et al.*, 2010). No entanto, as taxas de desenvolvimento de blastocisto foram drasticamente reduzidas quando a síntese de P4 pelas células do cumulus foi inibida usando Trilostano ou a sinalização de receptores de progesterona foi bloqueada usando RU 486 durante a MIV (APARICIO *et al.*, 2011). Em contraste, o componente de membrana do receptor de P4 (PGRMC1) e ligados à membrana (mPR) parecem estar envolvidos na maturação meiótica do oócito e na primeira mitose, respectivamente, pois a injeção intracitoplasmática de oócitos com anticorpo contra PGRMC1 afetou a segregação cromossômica durante a maturação meiótica do oócito (LUCIANO *et al.*, 2010) e a adição de um anticorpo específico para mPR α durante a MIV reduziu a porcentagem de oócitos que progrediram pelos estágios iniciais de clivagem (APARICIO *et al.*, 2011).

2.4.3 Progesterona no desenvolvimento da competência oocitária

Taxas mais baixas de apoptose em células do cúmulus foram correlacionadas com o potencial de desenvolvimento de competência em oócitos humanos e bovinos (LEE *et al.*, 2001; SALHAB *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2005). Estudos em células da granulosa periovulatória identificaram P4 como fator pró-sobrevivência e possível mediador das ações anti-atréticas do LH (FRIBERG; LARSSON; BILLIG, 2009; SVENSSON, E. CH *et al.*, 2000; SVENSSON, EVA CH *et al.*, 2001). A principal ação antiapoptótica da P4 é mediada por receptores de progesterona clássico em células da granulosa periovulatórias de rato (FRIBERG; LARSSON; BILLIG, 2009, 2010), pois o tratamento dessas células com o antagonista de receptores de progesterona aumentou a atividade das caspases 3 e 9 (FRIBERG; LARSSON; BILLIG, 2010).

Conseqüentemente, o tratamento de células luteais bovinas, com P4 por 24h, diminuiu a atividade da caspase-3 e a proporção de transcritos BAX/BCL2, enquanto a inibição de CYP11A1 (citocromo P450_{scc}) aumentou a atividade da caspase-3 e conseqüentemente, a apoptose nessas células (LISZEWSKA; REKAWIECKI; KOTWICA, 2005; SALHAB *et al.*, 2011).

Menores taxas de apoptose de células do cumulus e maior competência oocitária foram correlacionados com secreção de P4 por essas células, propondo que a P4 esteja envolvida na inibição da apoptose das células do cumulus por meio de vias associadas a SMAD2, JNK e fosforilação de AKT (SALHAB *et al.*, 2011). Além disso, estudos anteriores descreveram o papel do componente de membrana do receptor de P4 (PGRMC1) na mediação dos efeitos antiapoptóticos da P4 e do metabolismo do esteroide. (HUSSEIN *et al.*, 2005). Na verdade, é provável que os efeitos antiapoptóticos de P4 não se limitem a uma via, mas sejam atribuídos à regulação de várias vias e processos-chave que ocorrem durante a maturação do oócito (FAIR; LONERGAN, 2012).

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. M.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; *et al.* Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: I. Characteristics of LH secretion and oocyte quality. **Animal Reproduction Science**, v. 196, n. June, p. 59–68, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.020>>.
- ABREU, F. M.; GEARY, T. W.; *et al.* Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: II. Ovulatory follicle growth and pregnancy rates. **Animal Reproduction Science**, v. 196, n. March, p. 69–76, 2018.
- ADAMS, G. P. *et al.* Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 94, n. 1, p. 177–188, 1992.
- ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 14, n. 6, p. 411–420, 1980.
- AHMAD, N. *et al.* Relationship of Fertility to Patterns of Ovarian Follicular Development and Associated Hormonal Profiles in Dairy Cows and Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 8, p. 1943–1952, 1996.
- ALI, A.; SIRARD, M. A. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**, v. 130, n. 3, p. 303–310, 2005.
- ALVES, N. G.; PEREIRA, M. N.; COELHO, R. M. Nutrição e reprodução em vacas leiteiras Nutrition and reproduction in dairy cows. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 118–124, 2009.
- APARICIO, I. M. *et al.* Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 910–921, 2011.
- ASHKENAZI, H. *et al.* Epidermal growth factor family members: Endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77–84, 2005.
- BALLAROTTI, A.; SOUZA, A. H. DE. Produção e metabolismo da progesterona e seu papel antes, durante e depois da inseminação artificial influenciando a fertilidade de vacas leiteiras de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, p. 1–14, 2013.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* History , evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139–152, 2012.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. **Biotecnologia da reprodução em bovinos (2 Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada)**, n. 1977, p. 113–132, 2006.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.

82–83, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P. S. *et al.* Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558–571, 2017. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p558-571> (AR999) SBTE.pdf>.

BELTMAN, M. E. *et al.* Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1173–1179, 2009.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effect of oocyte quality on the relative abundance of specific gene transcripts in bovine mature oocytes and 16-cell embryos. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 151–156, 2003.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 01, p. 1451–1463, 2001.

BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3578–3587, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210003760>>.

BLACHE, D.; BATAILLER, M.; FABRE-NYS, C. Oestrogen Receptors in the Preoptico-Hypothalamic Continuum: Immunohistochemical Study of the Distribution and Cell Density During Induced Oestrous Cycle in Ovariectomized Ewe. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 6, n. 3, p. 329–339, 1994.

BLACHE, D.; FABRE-NYS, C. J.; VENIER, G. Ventromedial hypothalamus as a target for oestradiol action on proceptivity, receptivity and luteinizing hormone surge of the ewe. **Brain Research**, v. 546, n. 2, p. 241–249, 1991.

BLANCHARD, T. L. *et al.* Regulation of estrus and ovulation in mares with progesterone or progesterone and estradiol biodegradable microspheres with or without PGF2 α . **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 1091–1106, 1992.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 307–326, 2003.

BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. **Animal Reproduction Science**, v. 45, n. 1–2, p. 13–28, 1996.

CAIXETA, E. S. *et al.* Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 27–35, 2013.

CAMPOS, J. T. *et al.* Evaluation of pregnancy rates of *Bos indicus* cows subjected to different synchronization ovulation protocols using injectable progesterone or an intravaginal

device. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 6, p. 4149–4156, 2016.

CARATY, A.; SKINNER, D. C. Progesterone Priming Is Essential for the Full Expression of the Positive Feedback Effect of Estradiol in Inducing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone Surge in the Ewe. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 165–170, 1999.

CARVALHO, L. R. . *et al.* Serum profile of different doses of injectable progesterone in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **ABSTRACTS: 34TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE)**, 2020.

CASTILHO, C. *et al.* Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3–4, p. 189–196, 2007.

COLAZO, M. G. *et al.* Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 109–117, 2008.

COTICCHIO, G. *et al.* What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1034, p. 132–144, 2004.

DAY, M. L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrus *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 487–494, 2004.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, v. 1, n. 2, p. 82–88, 1996.

DIAZ, F. J. *et al.* Regulation of progesterone and prostaglandin F_{2α} production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 65–80, 2002.

DÍAZ, P. U. *et al.* Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1149–1160, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.015>>.

DIELEMAN, S. J. *et al.* Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 69, n. 2, p. 641–649, 1983.

DISKIN, M. G. *et al.* Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 345–370, 2003.

DRANSFIELD, M. B. G. *et al.* Timing of Insemination for Dairy Cows Identified in Estrus by a Radiotelemetric Estrus Detection System. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 7, p. 1874–1882, 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030298757583>>.

DUNNING, K. R. *et al.* Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. **Human Reproduction**, v. 22, n. 11, p. 2842–2850, 2007.

FAIR, T.; LONERGAN, P. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 142–147, 2012.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178–191, 2006.

FONSECA, F. A. *et al.* Reproductive Traits of Holsteins and Jerseys. Effects of Age, Milk Yield, and Clinical Abnormalities on Involution of Cervix and Uterus, Ovulation, Estrous Cycles, Detection of Estrus, Conception Rate, and Days Open. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 5, p. 1128–1147, 1983. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81910-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81910-9)>.

FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis and glutathione : beyond an antioxidant. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 10, p. 1303–1314, 2009.

FREIMANN, S. *et al.* EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 2, p. 829–834, 2004.

FRIBERG, P. A.; LARSSON, D. G. J.; BILLIG, H. Dominant role of nuclear progesterone receptor in the control of rat periovulatory granulosa cell apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 6, p. 1160–1167, 2009.

FRIBERG, P. A.; LARSSON, D. G. J.; BILLIG, H. Transcriptional effects of progesterone receptor antagonist in rat granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, n. 1–2, p. 121–130, 2010.

FÜLÖP, C. *et al.* Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. **Gene**, v. 202, n. 1–2, p. 95–102, 1997.

FW, B. *et al.* Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 3, p. 745–767, 2011.

GALLOWAY, S. M. *et al.* Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279–283, 2000.

GEBHARDT, K. M. *et al.* Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 1, p. 47–52.e2, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.033>>.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 23–31, 2011.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159–177, 2008.

GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation.

A study of the cumulus-oocyte complex. **Journal of Cell Biology**, v. 78, n. 1, p. 58–75, 1978.

GINTHER, O. J. The theory of follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 57, p. 85–99, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.002>>.

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, p. 2017–2020, 2019.

GRIMARD, B. *et al.* Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. **J Reprod Fertil**, v. 104, p. 173–179, 1995. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/content/abstract/104/1/173>>.

GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes and Development**, v. 13, p. 1899–1911, 1999.

GÜMEN, A.; WILTBANK, M. C. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. **Biology of reproduction**, v. 66, n. November 2001, p. 1689–1695, 2002.

HUSSEIN, T. S. *et al.* Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 22, p. 5257–5268, 2005.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: Changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v. 111, n. 6, p. 2077–2086, 1982.

IRVING-RODGERS, H. F.; RODGERS, R. J. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 1, p. 89–98, 2005.

ISOBE, N.; MAEDA, T.; TERADA, T. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, n. 2, p. 167–172, 1998.

JANSON, P. O.; DAMBER, J. E.; AXEN, C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 63, n. 2, p. 491–497, 1981.

JINWEN DONG, DAVID F ALBERTINO, KATSUHIKO NISHIMORI, T RAJENDRA KUMAR, NAIFANG LU, M. M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531–535, 1996.

KAUFFOLD, J. *et al.* The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 325–332, 2005.

KESLER, D. J. .; FAVERO, R. J. .; TROXEL, T. R. Comparison of hidron and silicone implants in the bovine norgestimate and estradiol valerate synchronization procedure. **Drug Development Industry Pharmacy**, v. 21, n. 4, p. 475–485, 1995.

LARSON, J. E.; KRISHER, R. L.; LAMB, G. C. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 2, p. 311–318, 2011.

LAVON, Y. *et al.* Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 911–921, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210000585>>.

LEE, K. S. *et al.* Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 18, n. 9, p. 490–498, 2001.

LEONHARDT, S. A.; EDWARDS, D. P. Mechanism of action of progesterone antagonists. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 11, p. 969–980, 2002.

LIMA, F. P. C. *et al.* Concentração sérica de progesterona em bezerras da raça nelore e mestiças tratadas com progesterona em veículo de liberação lenta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 600–604, 2007.

LISZEWSKA, E.; REKAWIECKI, R.; KOTWICA, J. Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 78, n. 1–4, p. 67–81, 2005.

LONERGAN, P. *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48–53, 1994.

LUCIANO, A. M. *et al.* Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 663–672, 2010.

LÜTTGENAU, J. *et al.* Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1–4, p. 20–29, 2011.

M.C., W. *et al.* Effect of progesterone concentration during follicle development on subsequent ovulation, fertilization, and early embryo development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 85, 2011.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3–4, p. 269–274, 1999.

MARTINEZ, I. Y. H. *et al.* Molecular and endocrine factors involved in future dominant follicle dynamics during the induction of luteolysis in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 111, p. 78–83, 2018.

MERMILLOD, P. *et al.* High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 1, p. 89–95, 2000.

MOROTTI, F. *et al.* Injectable progesterone in timed artificial insemination programs in beef

cows. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 17–22, 2018.

MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; SENEDA, M. M. Fixed-time artificial insemination using injectable progesterone: Ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of nelore cows (*Bos indicus*) with and without a corpus luteum. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6 SUPPL. 2, p. 3867–3876, 2013.

MURRAY, M. Microsomal cytochrome P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver. Quantitative importance of 6 β -hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIIA subfamily in the pathway. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 611–619, 1991.

MURRAY, M. Participation of a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 6, p. 591–593, 1992.

NASSER, L. F. *et al.* Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 320–327, 2011.

OCHSNER, S. A. *et al.* Disrupted function of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4376–4384, 2003.

OLTVAI, Z. N.; MILKMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 Heterodimerizes In Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programed Cell Death. **Cell**, v. 74, p. 609–619, 1993.

PANGAS, S. A.; JORGEZ, C. J.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32281–32286, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M403212200>>.

PARR, M. H. *et al.* Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein-Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v. 150, n. 1–2, p. 7–14, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.008>>.

PERCIAVALLE, R. M. *et al.* Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. 575–583, 2012.

PUGLIESI, G. *et al.* Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1239–1248, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.006>>.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, 1995.

QIU, H. B. *et al.* Membrane progesterin receptor beta (mPR- β): A protein related to cumulus expansion that is involved in in vitro maturation of pig cumulus-oocyte complexes. **Steroids**, v. 73, n. 14, p. 1416–1423, 2008.

RATHBONE, M. J. *et al.* Fertility regulation in cattle. **Journal of Controlled Release**, v. 54, n. 2, p. 117–148, 1998.

REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 106, p. 39–47, 1996.

RHODES, F. M. *et al.* Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 3–4, p. 139–150, 2002.

RICHANI, D.; GILCHRIST, R. B. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 1, p. 1–14, 2018.

RIVERA, F. A. *et al.* Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 141, n. 3, p. 333–342, 2011.

ROCHE, J. F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 3–4, p. 282–296, 2006.

RODRIGUES, A. D. P. *et al.* Progesterone-based strategies to induce ovulation in prepubertal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 135–141, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.018>>.

RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Molecular mechanisms of ovulation: Co-ordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 3, p. 289–312, 2007.

SÁ FILHO, M. F. *et al.* Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455–463, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.022>>.

SÁ FILHO, O. G. *et al.* Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210–218, 2009.

SAAD, M. *et al.* Effect of plasma progesterone on oocyte recovery, oocyte quality, and early in-vitro developmental competence of embryos in Bos indicus dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 202, n. October 2018, p. 80–86, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.001>>.

SALES, J. N. S. *et al.* Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous Bos indicus cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 86, n. 9, p. 2290–2295, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.023>>.

SALES, J. N. S. *et al.* Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in Bos indicus cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.031>>.

- SALHAB, M. *et al.* Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 90–104, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.014>>.
- SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1896–1912, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>>.
- SANGSRITAVONG, S. *et al.* High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2831–2842, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74370-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74370-1)>.
- SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, n. 3, p. 460–466, 2009.
- SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 269–277, 2003.
- SCHULTZ, R. M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **BioEssays**, v. 15, n. 8, p. 531–538, 1993.
- SHIMADA, M. *et al.* Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: Key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 6, p. 1352–1365, 2006.
- SHORT, R. E. *et al.* Factors Affecting Estrogen-Induced LH Release in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 683–689, 1979.
- SILVA, C. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **J Reprod Fertil**, v. 119, n. 2, p. 261–269, 2000.
- SIMÕES, L. M. S. *et al.* Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled Bos indicus cows. **Theriogenology**, v. 116, p. 28–33, 2018.
- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241–1254, 2001.
- SIRARD, MARC ANDRÉ *et al.* Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.
- SIRARD, MARC ANDRÉ. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 54–61, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.018>>.
- SMITH, D. L. *et al.* Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 5, p. 1102–1109,

2006.

SOLER, C. *et al.* The Trumorph® system: The new univ the morphology of living sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 158, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.001>>.

SOUZA, A. H. *et al.* Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 10–21, 2009.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108–1114, 1993.

STUMPF, T. T. *et al.* Progesterone, 17 β -estradiol, and opioid neuropeptides modulate pattern of luteinizing hormone in circulation of the cow. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 5, p. 1096–1101, 1993.

SVENSSON, E. CH *et al.* Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1457–1464, 2000.

SVENSSON, EVA CH *et al.* Progesterone receptor antagonists Org 31710 and RU 486 increase apoptosis in human periovulatory granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 6, p. 1225–1231, 2001.

SWENSON, M. J. .; REECE, W. O. **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 11^o ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 1996.

TANGHE, S. *et al.* Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 3, p. 414–424, 2002.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Effect of mid-luteal phase progesterone levels on the first wave dominant follicle in cattle. **Can.J.Anim.Sci.**, v. 74, n. 2, p. 281–285, 1994.

TILLY, J. L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v. 1, n. 3, p. 162–172, 1996.

TORRES-JÚNIOR, J. R. D. S. *et al.* Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte Technique and economic considerations about assisted reproduction in beef cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 53–58, 2009.

VARAGO, F. C.; MENDOÇA, L.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 100–109, 2008. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152 Varago pag100-109.pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152%20Varago%20pag100-109.pdf)>.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. (2001) Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes.pdf. v. 66, p. 175–184, 2001.

WHISNANT, C. S.; BURNS, P. J. Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers. **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1229–1235, 2002.

WILLIAMS, G. L. *et al.* Coincident Secretion of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Early Postpartum Beef Cows: Effects of Suckling and Low-Level Increases of Systemic Progesterone 1. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 2, p. 362–373, 1983. Disponível em:

<<https://scholar.google.com/scholar?q=43.+Williams+G%2C+Talavera+F%2C+Petersen+B%2C+Tilton+J.+Coincident+secretion+of+follicle-stimulating+hormone+and+luteinizing+hormone+in+early+postpartum+beef+cows%3A+effects+of+suckling+and+low-level+increases+of+syste>>.

WILTBANK, J. N. ; GONZALES-PADILLA. Synchronization and induction of estrus in heifers with a progestagen and estrogen. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 15, n. 2, p. 255, 1975.

WILTBANK, M. *et al.* Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17–29, 2006.

WILTBANK, M. C. *et al.* Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 238–243, 2012.

YAMASHITA, Y. *et al.* Progesterone is essential for maintenance of Tace/Adam17 mRNA expression, but not EGF-like factor, in cumulus cells, which enhances the EGF receptor signaling pathway during in vitro maturation of porcine COCs. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 3, p. 315–323, 2010.

YAN, C. *et al.* Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 854–866, 2001.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3–4, p. 159–169, 2002.

YUAN, Y. Q. *et al.* Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2147–2163, 2005.

ZONG, W. *et al.* BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. **Genes and Development**, v. 15, p. 1481–1486, 2001.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO **Exposição prévia à progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação não interfere na qualidade oocitária e expressão gênica de células do cumulus de vacas *Bos indicus* lactantes**

Artigo formatado segundo as normas da *Theriogenology*

Resumo

Com o objetivo de verificar a causa de maior taxa de prenhez em vacas *Bos indicus* suplementadas com progesterona injetável previamente ao protocolo de IATF, um experimento foi realizado para avaliar a qualidade oocitária e das células do cumulus. Vacas multíparas *Bos indicus* (n=30) foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais (Controle e P4i). As vacas do grupo Controle não receberam tratamento prévio ao protocolo de IATF. No grupo P4i, as vacas receberam 150 mg de progesterona injetável dez dias antes do início do protocolo de sincronização da emergência folicular (D-10). No D0, as vacas receberam 2mg de benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal de progesterona. Cinco dias depois (D5), as vacas foram submetidas à contagem e aspiração folicular (OPU). Após a aspiração folicular, os oócitos foram avaliados quanto a quantidade e qualidade e armazenados para avaliação da expressão gênica. A expressão relativa dos genes alvos em oócitos (*GDF9* e *BMP15*) e células do cumulus (*BAX*, *BCL2* e *HAS2*) foram avaliados por PCR em tempo real. Não houve diferença entre os tratamentos no número de folículos aspirados (P=0,63), no total de oócitos recuperados (P=0,15), no número de oócitos de grau 1 (P=0,32), grau 2 (P=0,70), grau 3 (P=0,90), degenerados (P=0,15), no índice de qualidade oocitária (P=0,86) e na taxa de oócitos viáveis (P=0,36). De forma semelhante, não foram observadas diferenças na quantificação de transcritos entre os grupos. Conclui-se que a progesterona injetável prévia ao protocolo de IATF não melhora a qualidade oocitária e não interfere no metabolismo das células do cumulus avaliados segundo esta metodologia.

Palavras-chave: IATF, progesterona, fertilidade, qualidade oocitária

Abstract

In order to verify the cause of higher pregnancy rate in *Bos indicus* cows supplemented with injectable progesterone prior to the FTAI protocol, an experiment was carried out to evaluate the oocyte and cumulus cell quality of these *Bos indicus* females. *Bos indicus* multiparous cows (n=30) were randomly assigned to two experimental groups (Control and P4i). Control group cows did not receive treatment prior to the FTAI protocol. In the P4i group, cows received 150 mg of injectable progesterone ten days before the start of the follicular emergence synchronization protocol (D-10). On D0, the cows received 2mg of estradiol benzoate and an intravaginal progesterone device. Five days later (D5), the cows were submitted to follicular counting and aspiration (OPU). After follicular aspiration, oocytes were evaluated for quantity and quality and stored for gene expression evaluation. The relative expression of target genes in oocytes (GDF9 and BMP15) and cumulus cells (BAX, BCL2 and HAS2) were evaluated by real-time PCR. There was no difference between treatments in the number of aspirated follicles (P=0.63), in the total of retrieved oocytes (P=0.15), in the number of grade 1 oocytes (P=0.32), grade 2 (P=0.70), grade 3 (P=0.90), degenerate (P=0.15), the oocyte quality index (P=0.86) and the rate of viable oocytes (P=0.36). Similarly, no differences were observed in the quantification of transcripts among groups. It is concluded that injectable progesterone prior to the FTAI protocol does not improve oocyte quality and does not interfere with the metabolism of cumulus cells evaluated according to this methodology.

Keywords: FTAI, progesterone, fertility, oocyte quality

Introdução

Atualmente, os protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) estão bem estabelecidos e aumentam significativamente a eficiência reprodutiva de vacas de corte [1]. No entanto, em vacas primíparas ou com baixo escore de condição corporal, observa-se menor resposta ao protocolo de sincronização da ovulação e taxa de prenhez [2]. Dessa forma, novas estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar a taxa de prenhez desses animais quando submetidos à IATF. O uso da progesterona injetável prévio ao protocolo de IATF tem se mostrado importante ferramenta para aumentar o diâmetro folicular no início do protocolo e a taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* no pós parto recente [3].

Nos protocolos de IATF, a progesterona atua aumentando a pulsatilidade de LH [4], promovendo a ovulação e a retomada da ciclicidade após o parto [5]. Esse mecanismo é mediado pela diminuição dos receptores de estrógeno e sua sensibilidade no hipotálamo, induzindo a liberação de GNRH [6], pela elevação das concentrações intrafoliculares/séricas de estradiol e pelo aumento de receptores de LH nas células da granulosa e da teca em folículos pré-ovulatórios [7]. Assim, vacas que não respondem ao protocolo de sincronização da ovulação podem ter tido um curto período de exposição à progesterona, já que vacas tratadas com progesterona injetável previamente à IATF apresentaram maior taxa de prenhez [3]. No entanto, ainda não se sabe o motivo desse aumento na prenhez.

A progesterona pode afetar a qualidade do oócito por interferir diretamente no desenvolvimento folicular [8]. Estudos tem demonstrado que oócitos que crescem sob maior concentração de progesterona (folículo da segunda onda) possuem melhor qualidade e conseqüentemente, maior fertilidade [9,10]. Além disso, a progesterona pode interferir na pulsatilidade de LH [4], estimulando a liberação de GnRH/LH por alterações na quantidade dos receptores de estrógeno no hipotálamo [11,12] e aumentando receptores de estrógeno nas regiões mais sensíveis de secreção de LH [11–13].

Dessa forma, com o intuito de explorar as condições foliculares e oocitárias de vacas que receberam suplementação de progesterona antes do protocolo de sincronização da ovulação, esse estudo foi delineado para verificar o efeito da progesterona injetável na qualidade oocitária e na expressão gênica dos oócitos e células do cumulus de vacas no pós parto recente submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação. A hipótese desse estudo é

que a P4 injetável prévia ao protocolo de sincronização da ovulação melhora a qualidade do oócito e o perfil metabólico das células do cumulus.

Material e métodos

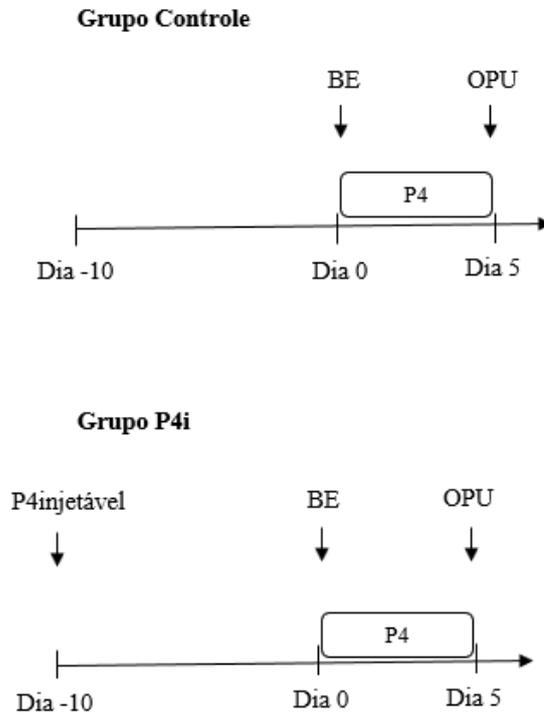
Animais e local de realização do estudo

O experimento foi conduzido em fazenda comercial localizada no sudeste do estado de Minas Gerais, Brasil. No estudo foram utilizadas 30 vacas multíparas *Bos indicus* (Nelore), em anestro com pós parto entre 30 e 90 dias e escore de condição corporal (ECC) médio de $2,5 \pm 0,4$ (escala de 1–5; [14]). Os animais foram mantidos em pastejo contínuo em *Brachiaria brizantha* e tiveram acesso *ad libitum* a água e suplementação mineral.

Desenho experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (Controle e P4i). As vacas do grupo Controle não receberam tratamento prévio ao protocolo de IATF. No grupo P4i, as vacas receberam 150 mg de progesterona injetável dez dias antes do início do protocolo de sincronização da ovulação (D-10). No D0, as vacas receberam 2mg de benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal de progesterona. Cinco dias depois (D5), as vacas foram submetidas à contagem e aspiração folicular (OPU; Figura 1). A ausência de corpo lúteo foi confirmada por ultrassonografia em D-10 e D0.

Figura 1 - Sincronização da onda de crescimento folicular para realização da aspiração dos oócitos (D5). No D-10 - administração de 150 mg de progesterona injetável nos animais do grupo P4i. No D0 - administração de 2 mg de benzoato de estradiol e um implante intravaginal de progesterona. No D5 - aspiração folicular de todos os folículos ≥ 2 mm e retirada do implante.



Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia

Os animais foram submetidos a uma sessão de aspiração folicular (OPU) realizadas no quinto dia protocolo (D5; Fig. 1). As aspirações foram realizadas com auxílio de ultrassonografia (US; Aloka, SSD500, Japão) com transdutor convexo (Aloka, transdutor convexo 7,5MHz, Japão) e linha de aspiração com 80 cm acoplada a agulha 20 G (WTA, Brasil). Antes das aspirações, foi realizada a contagem dos folículos antrais. O sistema de aspiração foi submetido a pressão negativa de 60-70 mmHg por bomba de vácuo (WTA). Todos os folículos visíveis (>2 mm) foram puncionados e o conteúdo foi coletado em tubo plástico de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) previamente preparado com 10 mL de solução tampão salina-fosfato (DMPBS®, Nutricell Nutrientes Celulares, Brasil) acrescida de 25 UI de heparina sódica/mL (Liquemine, Roche, Brasil) e mantida sob temperaturas entre 35 e 36°C. O tubo plástico contendo o líquido aspirado foi vertido em filtro para coleta de oócitos com malha de 80- μ m (WTA). Em seguida, o filtrado foi transferido para placa de petri específica para cultivo

celular de 100 x 20 mm, livres de DNase e RNase (Corning, EUA) contendo DMPBS acrescido de 1g de álcool polivinílico (PVA) para busca, avaliação e seleção dos complexos cumulus-oócitos (CCOs), sob estereomicroscópico (Nikon, SMZ645, Japão).

Análise morfológica e manipulação dos oócitos e células do cumulus

Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) contidos no fluido folicular foram submetidos a avaliação em relação à cor, homogeneidade e integridade do citoplasma, bem como a presença, número e grau de compactação das células do cumulus sob estereomicroscópio (Nikon®, SMZ645, Japão) e classificados [15]. O índice de qualidade oocitária [$IQO = (\text{grau I} * 1 + \text{grau II} * 2 + \text{grau III} * 3 + \text{não viáveis} * 4) / \text{total de oócitos}$] foi calculado, sendo que quanto menor o IQO, maior a qualidade oocitária [16]. Os oócitos viáveis selecionados (grau I, grau II e grau III) foram desnudados por pipetagem manual e o conjunto de oócitos desnudos foi armazenado em pools de até 25 oócitos em eppendorfs livres de DNase e RNase (Tubos Eppendorf 3810X standard, Eppendorf, Alemanha) contendo solução de PBS+RNAlater (RNAlater™ Stabilization Solution, Sigma, EUA) na proporção de 1:2. A solução residual contendo apenas células do cumulus foi centrifugada para retirada do sobrenadante e o pellet ressuspendido em solução PBS para a segunda centrifugação. O sobrenadante foi novamente desprezado e o volume do pellet final foi estimado para adição de quantidade equivalente de PBS. Por fim, RNAlater foi adicionado na proporção de 1:2µl (PBS+céls granulosa:RNAlater). O material preparado foi armazenado em nitrogênio líquido a temperatura de -196°C até o momento da extração de RNA.

Quantificação dos transcritos

Extração de RNA total e síntese de DNA complementar

Os oócitos e células do cumulus foram transportados em nitrogênio líquido para o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA – USP (Pirassununga, SP, Brasil), onde a quantificação dos transcritos foi realizada. O RNA total proveniente dos oócitos e das células do cumulus obtidas foi isolado com a utilização de reagente QIAzol Lysis

(Qiagen, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Solução de Glycoblue (Invitrogen, Califórnia, EUA) foi adicionada ao processo para melhor evidenciação do pellet contendo o RNA. O sedimento final obtido, de coloração azul, foi dissolvido em água livre de RNase (Nuclease-free water, Invitrogen, Califórnia, EUA) para mensuração da concentração final de RNA pelo Nanodrop One (ThermoScientific) pela absorvância 260 nm e a qualidade da leitura foi avaliada pela razão 260/280. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase para evitar eventual contaminação com DNA genômico. Conforme as instruções do protocolo DNase I (Invitrogen, Califórnia, EUA), foram adicionados 1 µL de DNase e 1 µL de DNase Reaction Buffer (Invitrogen, Califórnia, EUA). As amostras foram incubadas em termociclador por 15 minutos a 25 °C. Após esse tempo, foi adicionado 1 µL de EDTA para inativação da DNase e a amostra foi novamente incubada por 10 minutos à 65°C. Após o tratamento com DNase, iniciou-se o protocolo de transcrição reversa (RT) utilizando-se o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA). A reação foi conduzida utilizando o termociclador ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA), as amostras foram mantidas 25°C por 10 min, 37°C por 2 horas e 85°C durante 5 min. Ao final da reação de transcrição reversa, os cDNAs produzidos foram armazenados em freezer a -20°C até a realização da PCR.

Expressão gênica por PCR em tempo real

As avaliações dos genes alvos foram realizadas por ensaio de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção Power SybrGreen® (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA) no equipamento ABI QuantStudio® (Applied Biosystem, Foster city, CA, EUA). Os primers utilizados: *GDF9* (*growth differentiation factor 9*), *BMP15* (*bone morphogenetic protein 15*), *BAX* (*BCL2 Associated X Protein*), *BCL2* (*Cell Leucemia/Lymphoma 2*) e *HAS2* (*Hyaluronan Synthase 2*) foram delineados a partir da sequência disponível no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nih.gov). As sequências dos primers, tamanho do produto e número de acesso no GenBank para cada par de primers utilizados no experimento estão apresentados na tabela 1. A PCR foi otimizada a fim de obter máxima eficiência de amplificação para cada gene. As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando aproximadamente 7ng de cDNA para cada gene.

Tabela 1. Gene alvo, sequência dos primers (*forward* e *reverse*), tamanho do produto (pares de base – pb) e número de acesso dos primers usados para RT-qPCR nos oócitos e células do cumulus.

Gene	Sequência dos primers (5'–3')	pb	N. acesso.
<i>BAX</i>	FP: CCCGAGTTGATCAGGACCAT RP: CACTCCAGCCACAAAGATGG	153	NM_173894.1
<i>BCL-2</i>	FP: CTTTGTGGAGCTGTATGGC RP: CCAGATAGGCACCCAGGG	119	NM_001166486.1
<i>HAS2</i>	FP: CCTAAACATTTGAGACTCCCCC RP: CACAATGCATCTTGTTCAGCTC	193	NM_174079.2
<i>GDF9</i>	FP: CAGCCAGATGACAGAGCTTTGAG RP: CACTGATGGAAGGGTTCCTGCT	71	NC_037334.1
<i>BMP15</i>	FP: GCCTCGGATCTTAGGGCATC RP: TATGTGCCAGGAGCCTCTGA	177	NC_037357.1
<i>ACTB</i>	FP: CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC RP: AACGCAGCTAACAGTCCGCC	205	NM_173979.3
<i>RPL15</i>	FP: CAAACGCCAGTTCCTAAGG RP: TCGAGCAAACCTTGAGCTGGTT	76	NM_001077866.1
<i>PPIA</i>	FP: CATAcAGGTCCTGGCATC RP: CACGTGCTTGCCATCCAA	108	NM_178320.2
<i>YWHAZ</i>	FP: GCATCCCACAGACTATTTCC	120	NM_174814.2

A amplificação foi realizada com desnaturação inicial à 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos e anelamento à 60°C por 1 minuto. Os resultados das amostras de oócitos e células do cumulus tiveram expressão relativa ao *ACTB* (*beta actin*), *PPIA* (*peptidylprolyl isomerase A*), *RPL15* (*ribossomal protein L15*), e *YWHAZ*. Foi realizada análise de dissociação para garantir a especificidade do produto gerado. Os valores brutos de Ct (ciclos para *threshold*) foram normalizados pela média geométrica dos genes de referência (*ACTB*, *RPL15*, *PPIA* e *YWHAZ*), assim como já descrito em estudos similares [17]. Os resultados normalizados foram utilizados para calcular a expressão relativa por transformação $2^{-\Delta Ct}$. Controles negativos, compostos pela combinação de reagentes da reação

de PCR foram executados junto com cada grupo de amostras. A relação dos genes alvo e suas respectivas funções estão ilustradas na tabela 2.

Tabela 2. Símbolo e função dos genes avaliados nos oócitos e células do cumulus no pós parto de múltiparas *Bos indicus*

Símbolo do Gene	Função
<i>BAX</i>	Controle da apoptose
<i>BCL2</i>	Controle da apoptose
<i>HAS2</i>	Expansão do cumulus
<i>GDF9</i>	Controle da foliculogênese e maturação oocitária
<i>BMP15</i>	Controle da foliculogênese e maturação oocitária
<i>ACTB</i>	Gene de referência
<i>RPL15</i>	Gene de referência
<i>PPIA</i>	Gene de referência
<i>YWHAZ</i>	Gene de referência

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Statistical Analysis System for Windows SAS®* [18]. As variáveis relacionadas a qualidade oocitária (número de folículos, oócitos grau 1, grau 2 e grau 3, oócitos degenerados, total de oócitos recuperados e índice de qualidade oocitária) foram avaliadas pelo procedimento GLIMMIX utilizando distribuição de Poisson. No modelo estatístico foi incluído o efeito de tratamento, escore de condição corporal e interações. A análise estatística da quantificação relativa da PCR em tempo real foi realizada pelo Relative Expression Software Tool (REST®; [19]) que possui o modelo estatístico Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST® (versão 384 - Beta, 2005). Esse modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, como alternativa quando testes paramétricos não podem ser utilizados. Esses testes obtêm resultados a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento. As variáveis contínuas foram expressas em média e erro

padrão da média (média \pm EPM) e as binomiais em porcentagem (%). Foi considerado diferença significativa entre as variáveis testadas quando o valor de $P < 0,05$.

Resultados

Qualidade oocitária

Na avaliação das diferentes variáveis de qualidade oocitária, não houve interação entre tratamento e ECC ($P > 0,05$). Da mesma forma, não houve efeito de tratamento (Controle e P4i) no número de folículos aspirados, ($P = 0,63$), no total de oócitos recuperados ($P = 0,15$), no número de oócitos de grau 1 ($P = 0,32$), grau 2 ($P = 0,70$), grau 3 ($P = 0,90$), número de oócitos degenerados ($P = 0,15$), índice de qualidade oocitária ($P = 0,86$) e taxa de oócitos viáveis ($P = 0,36$; tabela 3).

Tabela 3. Avaliação quantitativa e qualitativa (média \pm erro) de oócitos obtidos por aspiração folicular (OPU) em vacas *Bos indicus* (n=30) submetidas a protocolo de sincronização da ovulação após a administração de 150 mg de P4 injetável

	Controle	P4i	P
Nº de folículos	25,8 \pm 2,6	27,4 \pm 5,4	0,63
Nº de oócitos			
Degenerados	5,3 \pm 0,9	3,9 \pm 0,5	0,15
Grau 1	2,3 \pm 0,6	1,8 \pm 0,5	0,32
Grau 2	4,1 \pm 0,4	3,7 \pm 0,9	0,70
Grau 3	3,6 \pm 0,7	3,6 \pm 0,7	0,90
Total de oócitos recuperados	15,4 \pm 1,6	13,1 \pm 1,8	0,15
Índice de qualidade oocitária	2,8 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	0,86
Taxa de oócitos viáveis (%)	65,3 (141/216)	69,9 (128/183)	0,36

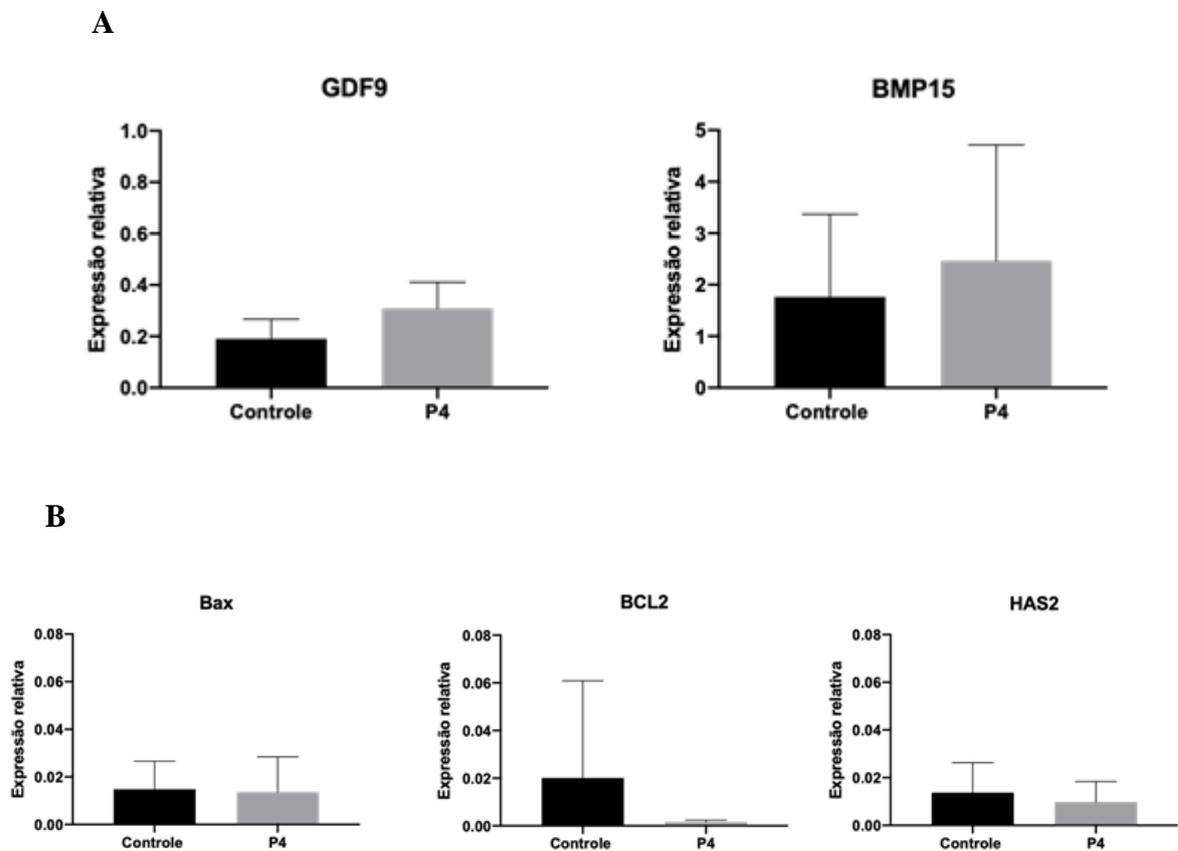
Índice de Qualidade Oocitária = (grau I*1+grau II*2+grau III*3+nãoviáveis*4)/total de oócitos;

Taxa de oócitos viáveis = total de oócitos viáveis (grau I + grau II + grau III)/total de oócitos

Expressão gênica dos oócitos e células do cumulus

Quantificação dos transcritos de oócitos e células do cumulus

Na avaliação dos genes presente nos oócitos, verificou-se que a abundância de transcritos para os genes *GDF9* e *BMP15* não diferiu entre os tratamentos ($P=0,52$ e $P=0,74$; respectivamente). Na avaliação dos genes presentes nas células do cumulus, a quantificação dos transcritos marcadores de apoptose *BAX* ($P=0,62$) e *BCL2* ($P=0,78$), a razão *BAX/BCL2* ($P=0,59$) e de expansão das células do cumulus *HAS2* ($P=0,55$) não diferiu entre os tratamentos (Controle e P4i; figuras 2).



Figuras 2. Expressão relativa dos transcritos (média±erro) associados à qualidade oocitária (*BMP15* e *GDF9*), ao controle da apoptose (*BAX* e *BCL2*) e expansão do cumulus (*HAS2*), obtidos por qPCR em tempo real de oócitos (A) e células do cumulus (B) de vacas *Bos indicus* submetidas aos tratamentos

Controle e P4i. Para todos os ensaios, foram utilizados quatro genes de referência (*ACTB*, *PPIA*, *RPL15* e *YWHAZ*).

Discussão

Em estudo anterior de nosso grupo pesquisa, verificou-se que a administração de 150mg de progesterona injetável previamente ao protocolo de IATF em vacas *Bos indicus* aumentou em aproximadamente 9% a taxa de prenhez IATF [3]. No entanto, as razões pelas quais a progesterona promoveu esse incremento na taxa de prenhez não foram esclarecidas, podendo suas ações serem a nível de hipotálamo, hipófise, ovários e útero. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avaliou a qualidade oocitária e de células do cumulus de vacas *Bos indicus* que receberam progesterona injetável previa ao protocolo de sincronização da ovulação. No presente estudo, verificou-se que as variáveis de qualidade oocitária e a quantificação de transcritos avaliados foram similares entre os grupos Controle e P4i. Assim, a hipótese de que vacas *Bos indicus* suplementadas com 150 mg de progesterona injetável dez dias antes do início do protocolo de IATF possuem maior fertilidade por interferência na qualidade oocitária e de células do cumulus não pode ser comprovada.

Os efeitos positivos na qualidade e competência oocitária da exposição endógena à progesterona observados em animais com presença de corpo lúteo em comparação com animais em anestro [8] não foram verificados nas vacas desse estudo. De forma semelhante, maiores concentrações de P4 durante o desenvolvimento folicular inicial não afetaram as características de desenvolvimento da competência oocitária (número de folículos aspirados por vaca, total de oócitos recuperados, taxa de recuperação oocitária, porcentagem de oócitos viáveis e abundância relativa de fosfatina; [20]. No entanto, os efeitos da progesterona no desenvolvimento folicular e na qualidade oocitária foram observados em vacas com alta progesterona durante o crescimento inicial do folículo [8,21]. No presente estudo, os animais estavam em anestro e a progesterona injetável foi administrada dez dias antes do início do protocolo de sincronização da ovulação visando melhorar a qualidade de oócitos ainda em folículos pré antrais no final da foliculogênese. Em animais cíclicos, com produção de progesterona pelo corpo lúteo ativo, o tempo de exposição à esse hormônio é maior, já que fisiologicamente a concentração sérica de P4 se mantém elevada por pelo menos quinze dias

[22]. Embora a mensuração da concentração sérica de P4 no momento aspiração folicular não tenha sido realizada, sabe-se que após a administração de 150 mg de P4 injetável observa-se aumento da concentração sérica de P4 nas primeiras 24 horas após o tratamento, seguida de uma diminuição gradual até 168 horas após a administração, quando permanece abaixo de 1,5 ng/mL [3]. Sendo assim, o tempo de exposição à progesterona pode não ter sido suficiente para afetar a qualidade oocitária e, embora a progesterona injetável tenha efeito no diâmetro folicular no dia do início do protocolo de IATF [3], parece não influenciar na qualidade oocitária da onda subsequente.

No protocolo de IATF, a progesterona atua aumentando a pulsatilidade de LH [4], pelo aumento de receptores de estrógeno no hipotálamo e na hipófise, estimulando a liberação de GnRH/LH [6,11,12]. Além disso, no folículo pré-ovulatório, maior expressão relativa de receptores de LH foi encontrada em células da granulosa quando o desvio folicular aconteceu sob altas concentrações de progesterona [23]. Esse é o primeiro trabalho que avaliou os efeitos da progesterona pré-protocolo e verificou-se que o aumento da fertilidade nas vacas tratadas com progesterona injetável não é causado pela melhora na qualidade oocitária. É possível que a maior taxa de prenhez esteja relacionada ao aumento da pulsatilidade de LH, já que o diâmetro folicular nos animais tratados é maior no início da IATF [3].

Dois importantes fatores secretados pelo oócito são o fator de crescimento diferencial 9 (GDF9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15), os quais ativam vias sinalizadoras nas células do *cumulus* para regular genes chaves e processos celulares importantes para diferenciação e para manutenção de seu próprio fenótipo (revisado por [24]). Além disso, deficiências na secreção de GDF9 e BMP15 pelo oócito resultam em desenvolvimento folicular anormal e infertilidade [25–27]. No entanto, a quantificação de transcritos relacionados à genes de qualidade oocitária (*GDF9* e *BMP15*) foram similares entre os tratamentos no presente estudo.

De forma similar, a quantificação de transcritos relacionados ao controle da apoptose (*BAX* e *BCL2*) e expansão do cumulus (*HAS2*) não diferiram entre os tratamentos. A expansão das células do cumulus relaciona-se positivamente com a maturação oocitária e fertilização [28], enquanto que taxas menores de apoptose em células do cumulus foram correlacionadas com o potencial de desenvolvimento da competência oocitária em oócitos humanos e bovinos [29–31] e a progesterona parece interferir nesses dois fatores [32]. *In vivo*, a progesterona intrafolicular previne degeneração dos oócitos e promove a maturação oocitária em primatas

[33]. *In vitro*, a inibição da síntese de P4 ou o bloqueio dos receptores de P4 reduziu a expansão do cumulus durante a maturação de oócitos bovinos [34]. Da mesma forma, o bloqueio da expressão da isoforma beta do receptor de progesterona de membrana durante a maturação *in vitro* prejudicou a expansão do cumulus em COCs suínos [35]. Em relação ao controle da apoptose, taxas menores de apoptose de células do cumulus e maior competência do oócito foram encontradas quando os COCs foram maturados em meio *in vitro*, o que promoveu a síntese de P4 pelas células do cumulus [31]. Além disso, estudos anteriores descreveram um papel do receptor progesterona de membrana na mediação dos efeitos antiapoptóticos da P4 [36]. No entanto, no presente estudo, a quantificação de transcritos que controlam a apoptose (*BAX* e *BCL*) e a expansão do cumulus (*HAS2*) não foi maior nos animais que receberam a progesterona injetável anteriormente ao protocolo de sincronização da emergência folicular. Como podemos inferir que a P4 exógena administrada antes do protocolo de sincronização da ovulação não afeta a quantificação de transcritos nos COCs, é possível que os efeitos positivos da P4 encontrados *in vivo* sejam devido a P4 produzido localmente no folículo pelas células da granulosa e do cúmulus durante a maturação do oócito e não a P4 produzida pelo CL ou exógena.

Em conclusão, a qualidade oocitária e a quantificação de transcritos avaliados nos oócitos e nas células do cumulus não diferiram entre vacas que receberam progesterona injetável dez dias antes do protocolo de sincronização da ovulação.

REFERÊNCIAS

- [1] Baruselli PS, Sales JNS, Sala R V, Vieira LM, Filho MFS. History , evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim Reprod* 2012;9:139–52.
- [2] Sales JNS, Bottino MP, Silva LACL, Giroto RW, Massoneto JPM, Souza JC, et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2016;86:2290–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.023>.
- [3] Simões LMS, Orlandi RE, Massoneto JPM, Scandiuzzi LA, Freitas BG, Bastos MR, et al. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 2018;116:28–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.031>.
- [4] Garcia-Winder M, Lewis PE, Townsend EC, Inskeep EK. Effects of norgestomet on follicular development in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 1987;64:1099–109. <https://doi.org/10.2527/jas1987.6441099x>.
- [5] Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 2009;72:210–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.008>.
- [6] Gümen A, Wiltbank MC. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biol Reprod* 2002;66:1689–95. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1689>.
- [7] Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Day ML, Macmillan KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim Reprod Sci* 2002;69:139–50. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00141-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00141-5).
- [8] Saad M, Sarwar Z, Saleem M, Arshad U, Shahzad M, Hassan Mushtaq M, et al. Effect of plasma progesterone on oocyte recovery, oocyte quality, and early in-vitro developmental competence of embryos in *Bos indicus* dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2019;202:80–6. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.001>.
- [9] Bisinotto RS, Chebel RC, Santos JEP. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 2010;93:3578–87. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3047>.
- [10] Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, et al. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011;76:320–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.009>.
- [11] Blache D, Batailler M, Fabre-Nys C. Oestrogen Receptors in the Preoptico-Hypothalamic Continuum: Immunohistochemical Study of the Distribution and Cell

- Density During Induced Oestrous Cycle in Ovariectomized Ewe. *J Neuroendocrinol* 1994;6:329–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1994.tb00590.x>.
- [12] Caraty A, Skinner DC. Progesterone Priming Is Essential for the Full Expression of the Positive Feedback Effect of Estradiol in Inducing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone Surge in the Ewe. *Endocrinology* 1999;140:165–70. <https://doi.org/10.1210/en.140.1.165>.
- [13] Blache D, Fabre-Nys CJ, Venier G. Ventromedial hypothalamus as a target for oestradiol action on proceptivity, receptivity and luteinizing hormone surge of the ewe. *Brain Res* 1991;546:241–9. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91488-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91488-M).
- [14] Ayres H, Ferreira RM, de Souza Torres-Júnior JR, Demétrio CGB, de Lima CG, Baruselli PS. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livest Sci* 2009;123:175–9. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.004>.
- [15] Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 1979;48:76–86.
- [16] Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS, Freitas C, et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci* 2015;98:1–14. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8858>.
- [17] Andrade GM, Coelho J, Perrini C, Del M, Meirelles V, Gebremedhn S, et al. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. *PLoS One* 2017;185:1–15.
- [18] SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM 2000.
- [19] Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1–10. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.
- [20] Abreu FM, Geary TW, Coutinho da Silva MA, Cruppe LH, Mussard ML, Madsen CA, et al. Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: II. Ovulatory follicle growth and pregnancy rates. *Anim Reprod Sci* 2018;196:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.011>.
- [21] Abreu FM, Coutinho da Silva MA, Cruppe LH, Mussard ML, Bridges GA, Harstine BR, et al. Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: I. Characteristics of LH secretion and oocyte quality. *Anim Reprod Sci* 2018;196:59–68. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.020>.
- [22] Adeyemo O, Heath E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 1980;14:411–20. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(80\)90052-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(80)90052-7).
- [23] Martinez IYH, Santos APC, Bottino MP, Orlandi RE, Santos G, Simões LMS, et al. Molecular and endocrine factors involved in future dominant follicle dynamics during the induction of luteolysis in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 2018;111:78–83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.019>.

- [24] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008;14:159–77. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>.
- [25] Jinwen Dong, David F Albertino, Katsuhiko Nishimori, T Rajendra Kumar, Naifang Lu MMM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;383:531–5.
- [26] Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000;25:279–83. <https://doi.org/10.1038/77033>.
- [27] Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, et al. Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *Mol Endocrinol* 2001;15:854–66. <https://doi.org/10.1210/mend.15.6.0662>.
- [28] Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, De Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002;61:414–24. <https://doi.org/10.1002/mrd.10102>.
- [29] Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:490–8. <https://doi.org/10.1023/A:1016649026353>.
- [30] Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JLMR, Dewulf J, Van Zeveren A, De Kruif A, et al. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 2005;63:2147–63. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.054>.
- [31] Salhab M, Tosca L, Cabau C, Papillier P, Perreau C, Dupont J, et al. Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology* 2011;75:90–104. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.014>.
- [32] Fair T, Lonergan P. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reprod Domest Anim* 2012;47:142–7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02068.x>.
- [33] Borman SM, Chaffin CL, Schwinof KM, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB. Progesterone promotes oocyte maturation, but not ovulation, in nonhuman primate follicles without a gonadotropin surge. *Biol Reprod* 2004;71:366–73. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023390>.
- [34] Aparicio IM, Garcia-Herreros M, O’Shea LC, Hensey C, Lonergan P, Fair T. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2011;84:910–21. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087411>.
- [35] Qiu HB, Lu SS, Ji KL, Song XM, Lu YQ, Zhang M, et al. Membrane progesterin receptor beta (mPR- β): A protein related to cumulus expansion that is involved in in vitro maturation of pig cumulus-oocyte complexes. *Steroids* 2008;73:1416–23.

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.07.007>.

- [36] Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 2005;118:5257–68.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02644>.